



**You have downloaded a document from
RE-BUS
repository of the University of Silesia in Katowice**

Title: Zastosowanie chromatografii cienkowarstwowej oraz innych instrumentalnych technik analitycznych do badania reakcji oscylacyjnych wybranych kwasów 2-arylopropionowych

Author: Robert Piętka

Citation style: Piętka Robert. (2007). Zastosowanie chromatografii cienkowarstwowej oraz innych instrumentalnych technik analitycznych do badania reakcji oscylacyjnych wybranych kwasów 2-arylopropionowych. Praca doktorska. Katowice : Uniwersytet Śląski

© Korzystanie z tego materiału jest możliwe zgodnie z właściwymi przepisami o dozwolonym użytku lub o innych wyjątkach przewidzianych w przepisach prawa, a korzystanie w szerszym zakresie wymaga uzyskania zgody uprawnionego.



UNIWERSYTET ŚLĄSKI
W KATOWICACH



Biblioteka
Uniwersytetu Śląskiego



Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego

Robert Piętka

**Zastosowanie chromatografii cienkowarstwowej oraz innych
instrumentalnych technik analitycznych do badania reakcji oscylacyjnych
wybranych kwasów 2-arylopropionowych**

Promotor pracy

Prof. zw. dr hab. T. Kowalska

Instytut Chemii
Uniwersytet Śląski
Katowice
2007

Składam serdeczne podziękowania

Pani Profesor zw. dr hab. Teresie Kowalskiej za cierpliwość, wyrozumiałość, poświęcony czas i pomoc oraz bardzo cenne uwagi podczas wykonywania pracy

Panu Doktorowi Mieczysławowi Sajewiczowi za twórczą i rzeczową współpracę oraz pomoc udzieloną w czasie wykonywania badań

Serdeczne podziękowania składam również firmie Merck za sponsorowanie niezbędnych do badań odczynników chemicznych i płytek chromatograficznych

Spis treści

| | str. |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1. Wstęp | 6 |
| 2. Chiralność | 7 |
| 2.1. Nomenklatura | 9 |
| 2.2. Strukturalne uwarunkowania chiralności | 11 |
| 2.3. Homochiralność. Niektóre teorie na temat przyczyn występowania homochiralności | 16 |
| 2.4. Enancjomeria leków a stosowanie racemicznych preparatów leczniczych | 17 |
| 2.5. Metody datowania znalezisk archeologicznych na podstawie znajomości kinetyki enancjomeryzacji wybranych aminokwasów | 19 |
| 2.6. Literatura | 21 |
| 3. Oddziaływania między związkami optycznie czynnymi a światłem spolaryzowanym | 22 |
| 3.1. Skręcalność optyczna, jej pomiar oraz sposoby wyrażania | 25 |
| 3.2. Dyspersja skręcalności optycznej | 27 |
| 3.3. Dichroizm kołowy | 28 |
| 3.4. Literatura | 30 |
| 4. Reakcje oscylacyjne | 31 |
| 4.1. Zasady termodynamiki a reakcje oscylacyjne | 32 |
| 4.2. Przyczyny występowania reakcji oscylacyjnych | 37 |
| 4.3. Teoretyczny model Brukselatora z członem dyfuzyjnym | 37 |
| 4.4. Literatura | 43 |
| 5. Żele fizyczne i zjawisko żelowania | 44 |
| 5.1. Chemia supramolekularna | 44 |
| 5.2. Żele – pojęcie i ogólne sposoby klasyfikacji | 45 |
| 5.3. Żelowanie fizyczne jako specyficzny rodzaj polimeryzacji bez udziału wiązań chemicznych | 46 |
| 5.4. Związki niskocząsteczkowe i ich predyspozycje strukturalne do występowania w charakterze związków – „gospodarzy” | 49 |
| 5.5. Literatura | 54 |
| 6. Zastosowanie technik chromatograficznych do rozdziału enancjomerów | 55 |
| 6.1. Chromatografia gazowa | 55 |
| 6.2. Wysokosprawna chromatografia cieczowa | 57 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 6.3. Chromatografia cienkowarstwowa | 62 |
| 6.4. Elektroforeza kapilarna | 64 |
| 6.5. Literatura | 69 |
| 7. Kwasy 2-arylopropionowe, ich izomeria optyczna oraz zastosowanie lecznicze | 73 |
| 7.1. Kwas 2-fenylopropionowy | 76 |
| 7.2. Ibuprofen | 77 |
| 7.3. Naproksen | 78 |
| 7.4. Literatura | 80 |
| 8. Cel pracy | 81 |
| 9. Część doświadczalna | 82 |
| 9.1. Odczynniki i materiały | 82 |
| 9.2. Sprzęt i aparatura | 85 |
| 9.3. Metodyka prowadzonych badań | 87 |
| 9.3.1. Badania prowadzone techniką TLC | 87 |
| 9.3.2. Badania prowadzone techniką HPLC | 90 |
| 9.3.3. Badania prowadzone z wykorzystaniem polarymetrii | 92 |
| 9.3.4. Badania prowadzone techniką ^1H NMR (spektroskopia magnetycznego rezonansu protonowego) | 95 |
| 9.3.5. Badanie lepkości | 96 |
| 9.4. Wyniki badań i ich omówienie | 97 |
| 9.4.1. Opracowanie nowoczesnych warunków rozdziału enancjomerów ibuprofenu techniką adsorpcyjnej chromatografii cienkowarstwowej na podstawie danych literaturowych | 97 |
| 9.4.2. Oscylacyjne zmiany wartości współczynnika opóźnienia (R_F) oraz skręcalności właściwej ($[\alpha]_D$) wybranych profenów podczas ich przechowywania w roztworze etanolowo-wodnym | 102 |
| 9.4.3. Oscylacyjne zmiany wartości współczynnika opóźnienia (R_F) oraz skręcalności właściwej ($[\alpha]_D$) wybranych profenów podczas ich przechowywania w roztworze dichlorometan | 114 |
| 9.4.4. Oscylacyjne zmiany wartości współczynnika opóźnienia (R_F) wybranych profenów podczas ich przechowywania w roztworze soli fizjologicznej | 125 |
| 9.4.5. Propozycje molekularnego mechanizmu transenancjomeryzacji profenów | 132 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 9.4.6. Badanie mechanizmu transenancjomeryzacji profenów techniką chromatografii cienkowarstwowej na przykładzie <i>S</i> -(+)-naproksenu | 136 |
| 9.4.6.1. Środowisko kwaśne | 137 |
| 9.4.6.2. Środowisko zasadowe | 139 |
| 9.4.6.3. Rozdział enancjomerów <i>S</i> -(+) i <i>R</i> -(-) naproksenu | 141 |
| 9.4.7. Badanie wybranych roztworów profenów technikami HPLC i ¹ HNMR oraz badanie wiskozymetryczne. Związek między lepkością a oscylacyjnym mechanizmem reakcji chemicznych | 144 |
| 9.4.8. O możliwości przeprowadzenia dwuwymiarowego rozdziału antymerów wybranych profenów techniką jednokierunkowej chromatografii cienkowarstwowej | 155 |
| 9.5. Streszczenie i wnioski | 161 |
| 9.6. Literatura | 166 |
| 10. Aneks (publikacje wchodzące w zakres tematyczny pracy doktorskiej) | 167 |

1. Wstęp

Jednym z najtrudniejszych i jednocześnie najbardziej istotnych zadań analitycznych w zakresie chemii organicznej jest rozdział par enancjomerów. Praktyczna istotność rozdziału par enancjomerów wynika m.in. z faktu, iż wiele leków jest połączeniami chiralnymi, przy czym niejednokrotnie antymer określonego, cennego leku może przejawiać właściwości toksyczne, wobec czego należy go odseparować od substancji o właściwościach pożądanых.

Technikami najwłaściwszymi do rozdzielania par enancjomerów są obecnie techniki chromatograficzne, charakteryzujące się największą sprawnością w zakresie rozdzielania mieszanin związków chemicznych na poszczególne składniki. Spośród technik chromatograficznych najczęściej do rozdziału par enancjomerów stosowanych należy wymienić wysokosprawną chromatografię cieczową i elektroforezę kapilarną. Sporym powodzeniem w omawianym zakresie cieszy się również chromatografia gazowa, historycznie najwcześniej zastosowana do tego typu rozdziałów. Proporcjonalnie najmniej prób było dotychczas podejmowanych z wykorzystaniem chromatografii cienkowarstwowej, mimo że technika ta jest znakomicie sprawna, zwłaszcza w przypadku rozdziału mieszanin dwuskładnikowych.

Niniejsze badania zostały podjęte z zamiarem dokonania pewnych istotnych przewartościowań, jeśli idzie o aktualne nastawienie badaczy zajmujących się chromatograficznym rozdziałem enancjomerów względem tej stosunkowo niedocenianej techniki, jaką jest chromatografia cienkowarstwowa. Tak więc pierwotnym celem niniejszej pracy była realizacja znacznej liczby pionierskich rozdziałów enancjomerów właśnie tą, z nieuzasadnionych powodów najrzadziej stosowaną, techniką. Na sam początek podjęta została próba powtórzenia opisanego w literaturze rozdziału pary enancjomerów leku o nazwie ibuprofen z zastosowaniem znacznie nowocześniejszej techniki pracy, aniżeli ta opisana w literaturze. W odróżnieniu bowiem od warunków przedstawionych w literaturze, w naszych badaniach dysponowaliśmy gotowymi płytkami chromatograficznymi, możliwością automatycznego nanoszenia próbek oraz densytometryczną detekcją.

Jak to się często w życiu zdarza, rzeczywistość niejako zmusiła nas do rewizji naszych początkowych planów, w zamian – w charakterze „rekompensaty” – podsuwając zadanie badawcze znacznie bardziej pasjonujące od pierwotnie zamierzonego. To właśnie nowe zadanie badawcze stało się przedmiotem realizacji i o nim właśnie oraz o uzyskanych w tym zakresie wynikach traktuje w całości niniejsza rozprawa.

2. Chiralność

W otaczającej nas przyrodzie często spotykamy się z przedmiotami lub z cząsteczkami chiralnymi (gr. cheir - ręka, dłoń). Do przedmiotów i cząsteczek chiralnych zaliczamy takie przedmioty i cząsteczki, które nie pokrywają się ze swoimi odbiciami lustrzanymi. Można do nich zaliczyć na przykład buty, rękawiczki czy w końcu nasze dłonie (rys.2.0.1). Cecha tych przedmiotów decydująca o tym, czy są one chiralne, czy też nie to brak w nich płaszczyzny symetrii. Z kolei przedmioty posiadające płaszczyznę symetrii będą określane jako przedmioty *achiralne*. Chiralność danej cząsteczki lub jej brak zależy więc od obecności lub braku płaszczyzny symetrii. Odmiany cząsteczek chiralnych nie są identyczne, zatem stanowią parę izomerów (z gr. isos – równy, meros – część).

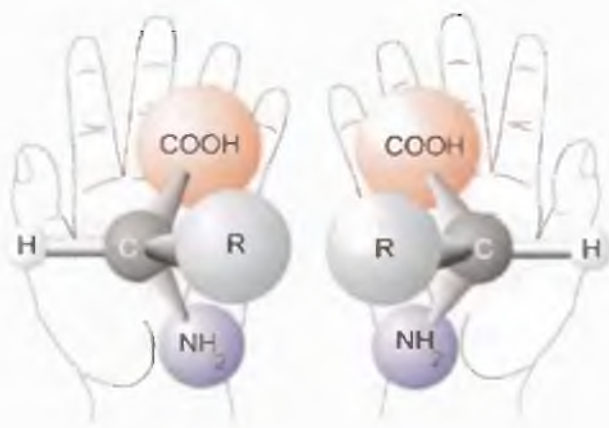
Izomery to związki, które mają taki sam wzór sumaryczny, ale różne wzory strukturalne. Rozróżniamy następujące rodzaje izomerii: a) izomerię konstytucyjną (strukturalną), gdy izomery różnią się od siebie sposobem połączenia atomów w cząsteczce; b) stereoizomerię, gdy cząsteczki różnią się wyłącznie przestrzennym rozmieszczeniem atomów (przy identycznej kolejności łączenia się tych atomów ze sobą). Zazwyczaj rozróżniamy dwa główne rodzaje stereoizomerów: izomery geometryczne (cis-trans) i izomery optyczne. W tej pracy skupimy się wyłącznie na stereoizomerii, a właściwie na jednym z jej rodzajów: na izomerii optycznej. Badania z zakresu stereoizomerii głównie dotyczą izomerii optycznej oraz wybranych aspektów przestrzennej budowy cząsteczek.

Chiralność jest warunkiem koniecznym i wystarczającym istnienia enancjomerii. Cząsteczki chiralne występują w postaci dwóch odmian zwanych enancjomerami (z gr. enantios morphe – przeciwny kształt), różniących się konfiguracją przestrzenną elementów strukturalnych. Cząsteczki achiralne (tzn., takie, które są pozbawione chiralności) nie mogą występować w formach enancjomerycznych. Enancjomery danego związku nie różnią się takimi właściwościami, jak masa cząsteczkowa czy polarność. Cząsteczki chiralne mają zdolność skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego, są więc czynne optycznie. Takiej właściwości nie posiadają cząsteczki achiralne. Dwa enancjomery danego związku skręcają płaszczyznę światła spolaryzowanego o ten sam kąt, ale w przeciwną stronę. Jeden enancjomer jest lewoskrętny, tzn., skręca płaszczyznę światła spolaryzowanego w lewo, a drugi prawoskrętny, tzn., skręca płaszczyznę światła spolaryzowanego w prawo [1]. Dwa enancjomery mają takie same wartości energii swobodnej (tzn. jeden ma wartość ze znakiem plus, a drugi ze znakiem minus). Zatem różnica energii swobodnej tych dwóch enancjomerów jest równa zero (ΔG). Stała równowagi reakcji (K) jest równowagowym stosunkiem

między stężeniem produktu a stężeniem substratu. Zależność ilościowa w dowolnej temperaturze dana jest równaniem:

$$K = \exp(-\Delta G/RT), \quad (2.0.1)$$

gdzie R oznacza stałą gazową równą $8.314 \text{ J/(K}\cdot\text{mol)}$, a T oznacza temperaturę w kelwinach [K]. Dla reakcji zamiany jednego enancjomeru w drugi zmiana energii swobodnej jest równa zero, więc stała równowagi reakcji przyjmuje wtedy wartość równą jedności. Z taką sytuacją mamy do czynienia wtedy, gdy stężenia obydwu enancjomerów są sobie równe. Mieszanina enancjomerów o stosunku 1:1 nazywana jest mieszaniną racemiczną. Mieszanina racemiczna nie skręca płaszczyzny światła spolaryzowanego, więc jest optycznie nieczynna [2].



Rys.2.0.1. Graficzne przedstawienie dwóch enancjomerów [3]

Za odkrywcę chiralności uznaje się Ludwika Pasteura, który w 1848 r. w ogłoszonej drukiem pracy przedstawił wyjaśnienie zjawiska występowania kwasu winowego w postaci różnych odmian oraz postulował dyssymetryczną, przestrzenną budowę tego kwasu (rys.2.0.2).

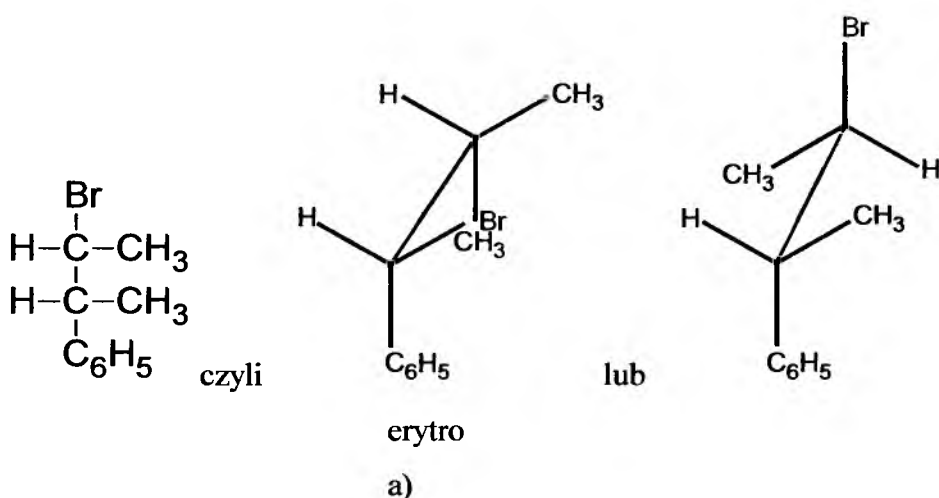


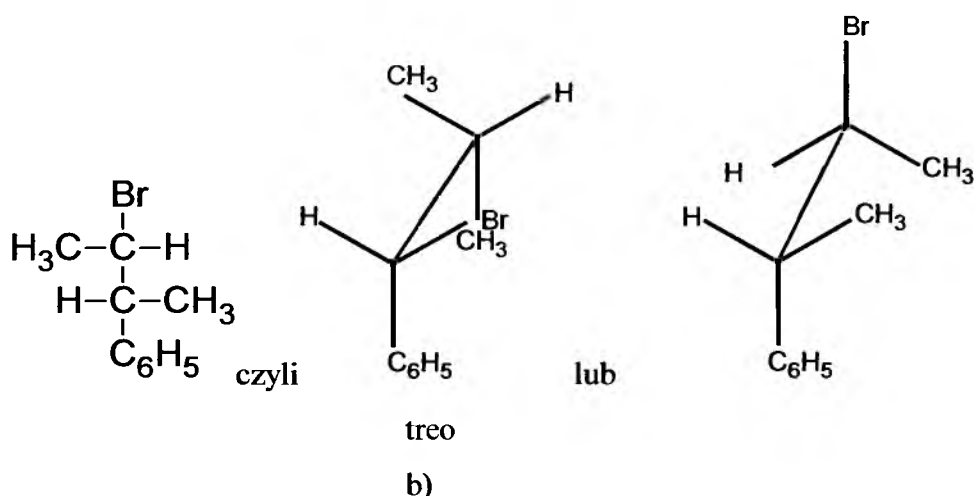
Rys.2.0.2 (a) Kwas D-(-)-winowy, (b) kwas L-(+)-winowy

Istnienie chiralności pociąga za sobą dalsze konsekwencje. W przyrodzie oddziaływania molekuł chiralnych występują często w procesach z udziałem enzymów i receptorów, i mają one charakter oddziaływań na zasadzie "klucza i zamka" ("pasuje" lub "nie pasuje") [4-6].

2.1. Nomenklatura

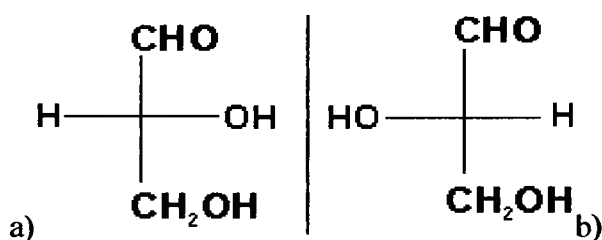
Atom węgla posiadający cztery różne podstawniki nazywamy asymetrycznym atomem węgla. Enancjomery to odmiany związku będące wzajemnymi odbiciami lustrzanymi. Stereoizomery, które nie są enancjomerami, a tym samym nie są wzajemnymi odbiciami lustrzanymi, zwane są diastereoizomerami (diastereomerami). Enancjomery mają takie same właściwości z wyjątkiem własności optycznych, natomiast diastereoizomery zazwyczaj mają znacząco różne właściwości fizyczne. Diastereoizomery zawierające parę sąsiadujących ze sobą nierównocennych asymetrycznych atomów węgla często odróżnia się od siebie za pomocą przedrostka *treo* lub *erytro*, przez analogię z *treozą* i *erytrozą*. Diastereoizomer *erytro* to ten, w którym co najmniej dwie pary identycznych lub podobnych podstawników sąsiadują z sobą w jednej z jego trzech naprzeciwległych konformacji, podczas gdy w przypadku diastereoizomeru *treo* podobne lub identyczne podstawniki są od siebie maksymalnie oddalone (rys.2.1.1) [7a].





Rys.2.1.1. 2-Bromo-3-fenylobutan; (a) struktura erytro; (b) struktura treo [7a]

Prawie wszystkie (poza glicyną i aminokwasami mającymi więcej niż jedno centrum asymetrii) aminokwasy mogą istnieć w postaci dwóch izomerów optycznych: L i D [6,8]. Określenie D i L ma swój początek w opisie budowy aldehydu glicerynowego. Aldehyd glicerynowy, mający w swojej strukturze jeden asymetryczny atom węgla tworzy dwa enancjomery. Jeden z nich nazwano enancjomerem D, drugi zaś enancjomerem L (rys.2.1.2) [9]. W 1894 r. Fischer wysunął hipotezę, że cząsteczki chiralne jednej molekuly „czują” różnice pomiędzy lustrzanymi odbiciami drugiej molekuly, tak samo, jak np. lewa noga czuje różnicę pomiędzy prawym butem, a lewym butem i zdecydowanie lepiej czuje się w bucie lewym. Jednak czasami molekuly chiralne nie reagują tak z innymi molekułami chiralnymi jak przykładowa lewa noga z lewym butem [8].



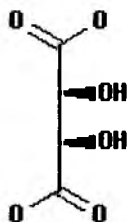
Rys.2.1.2. (a) Aldehyd D-(+)-glicerynowy; (b) aldehyd L-(-)-glicerynowy

Oprócz oznaczenia L i D stosuje się też powszechnie nową konwencję, którą zaproponowali Cahn, Ingold i Prelog w latach sześćdziesiątych ubiegłego stulecia. W nowym systemie ustala się oddzielnie konfigurację dla każdego chiralnego atomu węgla, występującego w danej cząsteczce. Jeśli najmniej ważny podstawnik umieścimy z tyłu

cząsteczki, a pozostałe podstawniki połączymy zgodnie z regułami ważności od 1 do 3, to w przypadku, kiedy kierunek łączenia od 1 do 3 jest zgodny z ruchem wskazówek zegara, mamy do czynienia z konfiguracją R (rectus - łac. prawy), natomiast w przeciwnym przypadku mamy do czynienia z konfiguracją S (sinister – łac. lewy).

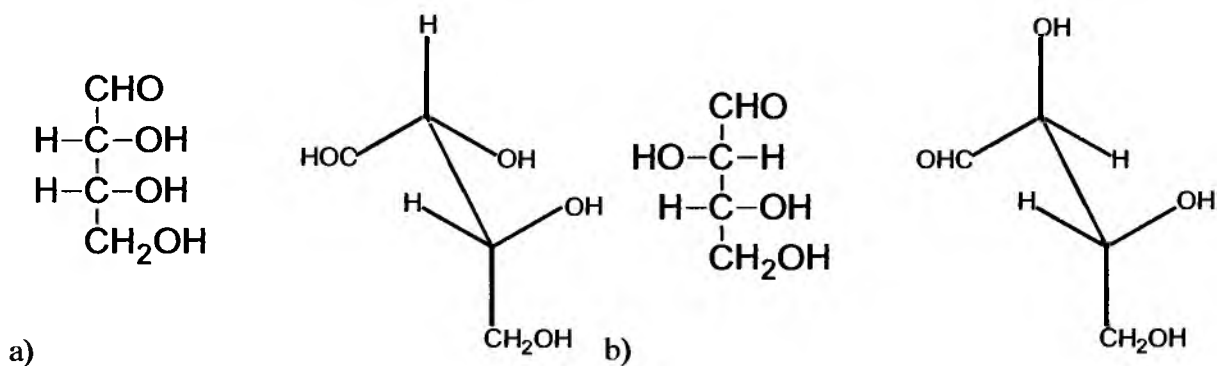
2.2. Strukturalne uwarunkowania chiralności

Czynnikiem decydującym o tym, czy dana cząsteczka jest chiralna, czy też nie, jest obecność asymetrycznego atomu węgla. W przypadku cząsteczek zawierających jeden asymetryczny atom węgla sprawa wydaje się być jednoznaczna. Natomiast jeśli w cząsteczce są obecne dwa i więcej asymetrycznych atomów węgla, to może się zdarzyć tak, że pomimo, iż w cząsteczce są obecne centra asymetryczne, to cała cząsteczka może być symetryczna. Z tego typu sytuacją spotykamy się w przypadku kwasu winowego, a ściślej mówiąc w przypadku jednego ze stereoizomerów, tzw. formy mezo (rys.2.2.1).



Rys.2.2.1. Kwas mezo winowy

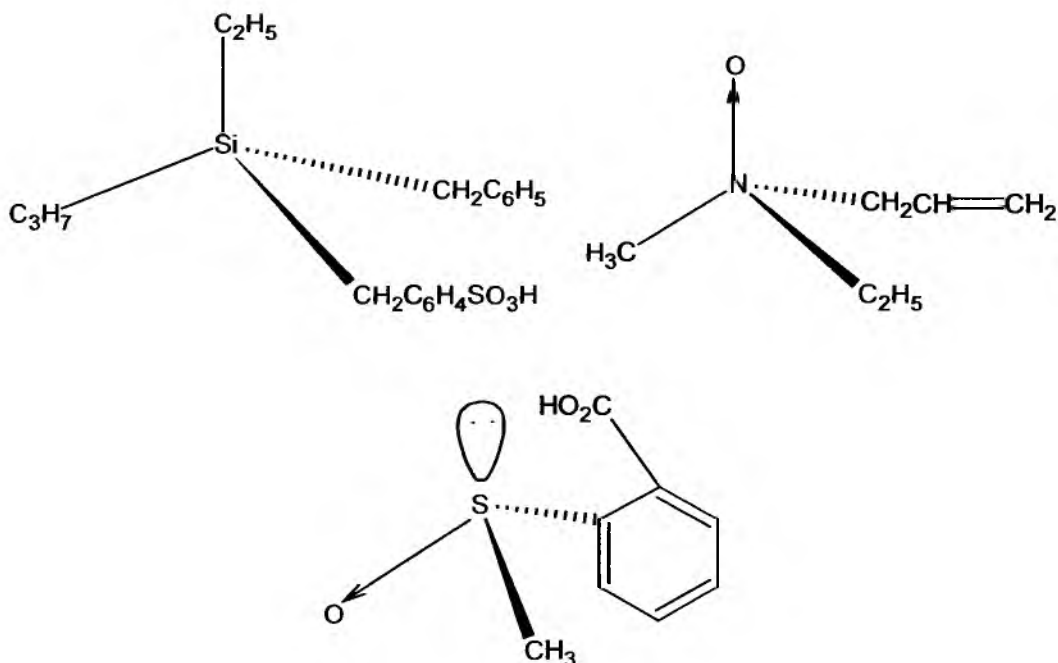
Izomer mezo jest nieczynny optycznie, pomimo posiadania asymetrycznych atomów węgla. Jest to spowodowane tym, że izomer ten posiada płaszczyznę symetrii. Jeśli w cząsteczce jest n asymetrycznych atomów węgla, to teoretycznie może wystąpić 2^n izomerów optycznych, pod warunkiem, że nie ma izomerów optycznych zawierających płaszczyznę symetrii, jak w przypadku odmiany mezo. Istnieje bardzo duża liczba związków posiadających dwa asymetryczne atomy węgla, ale nie występujących w wewnętrznie skompensowanej odmianie mezo. Przypadek taki istnieje wówczas, gdy dwa asymetryczne atomy węgla są różnie podstawione tak, że nie ma konformacji, w której którykolwiek izomer miałby płaszczyznę symetrii [7b]. Rozpatrzmy dwie diastereoizomeryczne aldozy, znane pod nazwami erytroza i trezoza (rys.2.2.2).



Rys.2.2.2. (a) Erytroza i (b) treoza, przedstawione przy pomocy wzorów rzutowych i wzorów perspektywicznych, konformacyjnych [7c]

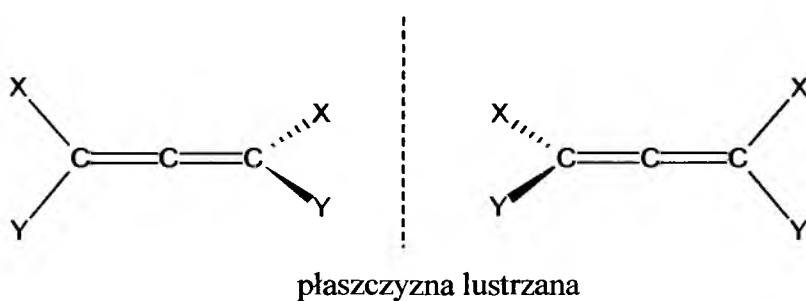
Żaden z przedstawionych powyżej związków nie posiada płaszczyzny symetrii, wskutek czego istnieją dwie pary enancjomerów, czyli ogółem cztery izomery optyczne (zgodnie z regułą 2^n).

Oprócz cząsteczek chiralnych posiadających asymetryczny atom węgla spotykamy także związki chiralne, w których centrum chiralnym jest atom inny niż węgiel, np. atom azotu, krzemu, czy siarki (rys.2.2.3).



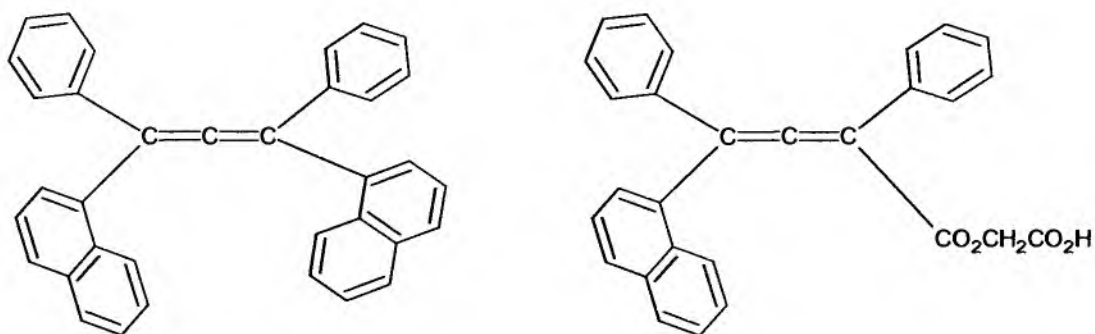
Rys.2.2.3. Związki posiadające centrum asymetrii zlokalizowane na atomie innego pierwiastka, niż węgiel [10]

Zatem obecność asymetrycznego atomu węgla w cząsteczce nie jest warunkiem koniecznym do tego, by związek ten posiadał centrum asymetrii. Nie jest też konieczne, by atomami tymi były przedstawione powyżej atom siarki, azotu czy krzemu. Istnieje wiele związków, które w ogóle nie posiadają atomów asymetrycznych, lecz mimo to wykazują izomerię optyczną. Z sytuacją taką spotykamy się czasem w przypadku zahamowanej rotacji. W cząsteczce allenu ($\text{H}_2\text{C}=\text{C}=\text{CH}_2$) dwie płaszczyzny zawierające grupy końcowe są wzajemnie do siebie prostopadłe z powodu sztywności i kierunkowego charakteru dwóch skumulowanych wiązań podwójnych. Wobec tego pochodna allenu typu $\text{XYC}=\text{C}=\text{CXY}$, w której X i Y są różne, jest asymetryczna i może występować w dwóch nie dających się na siebie nałożyć odmianach optycznie czynnych (rys.2.2.4)



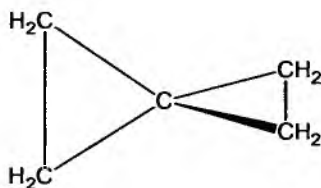
Rys.2.2.4. Ogólny wzór pochodnej allenu [7d]

Izomeria optyczna allenów została przewidziana przez Van't Hoffa około sześćdziesięciu lat wcześniej, nim jeszcze udało się ją doświadczalnie potwierdzić. Opóźnienie to wynikało z trudności w rozdzieleniu asymetrycznych pochodnych allenu (rys.2.2.5).



Rys.2.2.5. Pierwsze pochodne allenu, które udało się rozdzielić na enancjomery [7d]

Taki sam rodzaj asymetrii mogą wykazywać spirany, które są związkami dwupierścieniowymi z jednym atomem wspólnym dla obu pierścieni. Najprostszym związkiem spełniającym ten warunek jest spiro[2.2]pentan (rys.2.2.6).



Rys.2.2.6. Wzór strukturalny spiro[2.2]pentanu [7d]

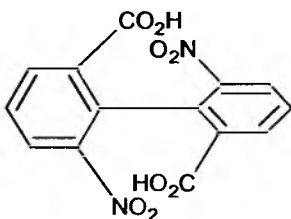
Dwa pierścienie spiro[2.2]pentanu (lub każdego innego spiranu) nie mogą leżeć w jednej wspólnej płaszczyźnie. Jeśli każdy z pierścieni jest tak podstawiony, że nie ma płaszczyzny symetrii, to wtedy taka pochodna istnieje w postaci pary optycznie czynnych enancjomerów.

Znacznie wcześniej, niż optyczną czynność allenów, wykryto optyczną czynność w szeregu bifenylu (rys.2.2.7).



Rys.2.2.7. Wzór strukturalny bifenylu [7e]

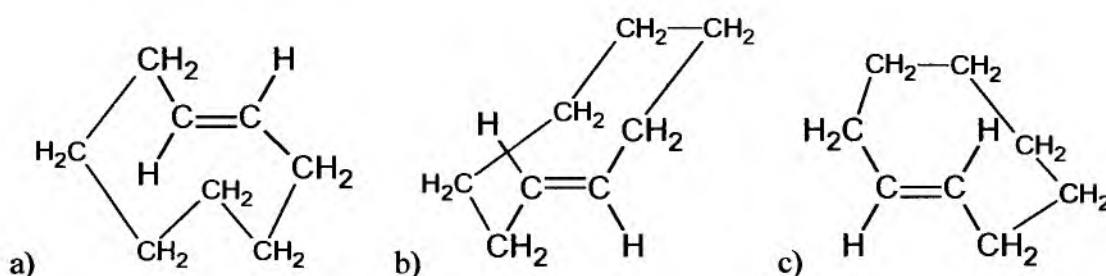
Istnienie trwałych optycznie czynnych izomerów w przypadku pochodnej bifenylu, jaką jest kwas o,o'-dwunitrobifenowy (rys.2.2.8) można wytłumaczyć tylko wtedy, gdy założy się, że nie ma rotacji wokół wiązania między dwoma pierścieniami fenyłowymi i że leżą one w dwóch różnych płaszczyznach. Kwas o,o'-dwunitrobifenowy spełnia powyższe warunki, nie daje się nałożyć na swe odbicie lustrzane i dlatego posiada czynność optyczną.



Rys.2.2.8. Wzór strukturalny kwasu o,o'-dwunitrobifenowego [7e]

Obecność dużych podstawników w pochodnej bifenylowej w pozycjach orto jest przeszkodą przestrzenną, powodującą brak rotacji wokół wiązania łączącego oba pierścienie. Dzięki temu możemy taką pochodną rozdzielić na enancjomery. Rozdzielenie pochodnych bifenylu podstawionych w innych pozycjach, niż orto, jest niemożliwe. Jednakże nie wszystkie cztery pozycje orto muszą być podstawione. Czynność optyczna wystąpi także w sytuacji, gdy podstawnik lub podstawniki będą dostatecznie duże i uniemożliwią swobodną rotację oraz każdy z pierścieni będzie niesymetrycznie podstawiony.

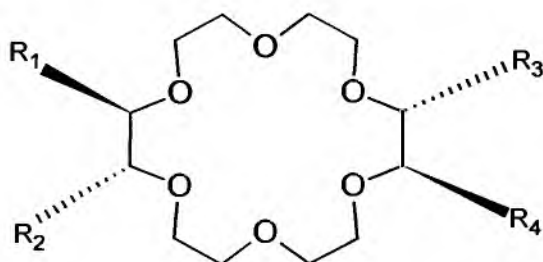
Czynność optyczną wykazują także trans-cykloalkeny. Jest to zjawisko o tyle zaskakujące, że związki te posiadają płaszczyznę symetrii przechodzącą przez wiązanie podwójne i przez inne atomy pierścienia.



Rys.2.2.9. Konformacje płaska (a) i niepłaskie (b) i (c) trans-cykloalkenu na przykładzie cyklooktenu. Dla cyklooktenu konformacja płaska jest konformacją o bardzo dużych napięciach [7f]

W cyklooktenie, w którym łańcuch łączący końce podwójnego wiązania jest krótki, przeszkody steryczne nie pozwalają na łatwe utworzenie konformacji płaskiej i dlatego każda z odmian lustrzanych może być trwała.

Do związków optycznie czynnych należy zaliczyć także eter koronowy 18-korona-6 (rys.2.2.10). Obecność czterech różnych podstawników powoduje, że związek ten występuje w dwóch odmianach, nie dających się nałożyć na siebie.



Rys.2.2.10. Wzór strukturalny eteru koronowego 18-korona-6 [11]

2.3. Homochiralność. Niektóre teorie na temat przyczyn występowania homochiralności

Homochiralność jest to występowanie naturalnych związków chemicznych w ożywionej przyrodzie tylko w postaci jednego rodzaju enancjomeru. Homochiralność jest charakterystyczną cechą życia na Ziemi. Natura preferuje tylko jedną z asymetrycznych odmian związku chiralnego [12-14]. Podczas przemian chemicznych w organizmach żywych zachodzą procesy, które preferują tylko jeden rodzaj enancjomerów. W typowych białkach i peptydach, spotykanych w organizmach ssaków występują niemal wyłącznie aminokwasy szeregu L. Nielicznymi wyjątkami są pewne peptydy pełniące tak specjalne funkcje, jak np. antybiotyki peptydowe. Fakt, że w naturze spotyka się niemal wyłącznie polipeptydy zbudowane z aminokwasów jednego tylko szeregu: L, ogromnie zwiększa wydajność i szybkość procesów syntezy, gdyż odpada konieczność etapu rozpoznawania chiralności substratu – aminokwasu - oraz odrzucania cząsteczek “nie pasujących”. Jest to również oszczędność materiałowa. Prócz tego upraszcza się “oprzyrządowanie” biochemiczne w postaci wyposażenia organizmów w enzymy uczestniczące w tego typu przemianach. Trzeba pamiętać, że przy aminokwasach, możliwość występowania większości z nich w dwóch formach przestrzennych powodowałoby astronomiczne wręcz zwiększenie liczby kombinacji budowy produktu – polipeptydu! Czy są jednak jakieś przesłanki do tego, iż Natura, zdecydowała się wykorzystywać np. do syntezy białek głównie L-aminokwasy, a nie ich antymery D? Od niedawna wiemy, iż łańcuchy zbudowane z L-aminokwasów są trwalsze od ich analogów zbudowanych z D-aminokwasów. Z obliczeń dla struktury dwóch regularnych konformacji peptydów wynika, iż różnica ta jest niewielka i wynosi 10^{-14} J/mol, czyli w warunkach równowagi enancjomer L stanowi 50.0000000000000001 % ogólnej mieszaniny [15]. Czy tak minimalna różnica energii mogła jednak zdecydować o tym, że jesteśmy zbudowani z białek zawierających wyłącznie L-aminokwasy? Również D-cukry, z których jesteśmy zbudowani, są trwalsze niż odpowiadające im L-cukry. Konsekwencje homochiralności naszych organizmów mogą być różnorakie. Dzieje się tak dlatego, że organizm człowieka jako czuły instrument chiralny potrafi odróżnić niektóre z izomerów lustrzanych, np. (-)-mentol ma zapach mięty, a (+)-mentol pachnie stęchlizną [2,9].

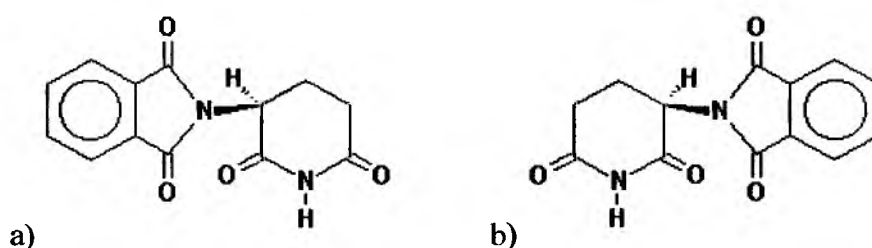
Poniżej przedstawiono kilka koncepcji zakładających istnienie jakiegoś czynnika fizycznego, preferującego określone formy enancjomerów [15]:

- ✓ Autokataliza; poprzez wprowadzenie do środowiska nadmiaru chociaż jednej formy chiralnej, całe środowisko stanie się chiralne.
- ✓ Przewaga określonego enancjomeru w określonych warunkach fizycznych. Czynnikiem prowadzącym do przewagi określonego enancjomeru może być światło spolaryzowane, katalizujące w niektórych reakcjach powstawanie określonego enancjomeru.
- ✓ Model Franka, ogłoszony w 1953 r., przez Sir Frederica Charlisa Franka z Uniwersytetu w Bristolu. Model ten zakłada istnienie konkurencji między formami, między którymi równowaga jest niestabilna. Pojawienie się jakiegoś czynnika (jak choćby fluktuacja losowa) zaburzającego symetrię, spowoduje spontaniczne przejście układu w stan asymetryczny, w którym może dojść do całkowitej dominacji jednej formy.
- ✓ Teoria "dog eat dog" zakładająca, że jeden organizm „zjadł” drugi. Teoria ta zakłada, że spotkanie się struktury lewoskrętnej z prawoskrętną doprowadzi do powstania struktury achiralnej, czyli obojętnej. Spotkanie się struktury lewoskrętnej z obojętną spowoduje powstanie struktury lewoskrętnej, natomiast spotkanie struktury prawoskrętnej z obojętną sprawi, że powstanie struktura prawoskrętna.

2.4. Enancjomeria leków a stosowanie racemicznych preparatów leczniczych

Poważnym problemem może być stosowanie chiralnych leków. Problem wynika stąd, że zazwyczaj tylko jeden z izomerów ma właściwości lecznicze, natomiast ten drugi może mieć wręcz właściwości toksyczne. Ilość enancjomerów, jaka może występować w leku zależy od liczby asymetrycznych atomów węgla. Jeśli są to substancje syntetyczne, to stanowią one z reguły mieszaninę enancjomerów lub diastereoizomerów [16-18]. Najbardziej dramatycznym przykładem było wprowadzenie na rynek w Europie Zachodniej w roku 1957 leku o nazwie talidomid (rys.2.4.1), który jest pochodną kwasu glutarowego. Lek ten był szeroko stosowany na przełomie lat pięćdziesiątych i sześćdziesiątych ubiegłego stulecia. Był lekiem nasennym, środkiem uspokajającym i przeciwwymiotnym, otrzymywanym

syntetycznie i podawanym w postaci racemicznej. Sprawiał wrażenie doskonałego środka uspokajającego i antydepresyjnego. Zalecany był m.in. w zaburzeniach nerwicznych u kobiet ciężarnych. Był sprzedawany bez recepty, gdyż uważano go za lek całkowicie bezpieczny – nawet duże przedawkowanie nie groziło śmiercią. W trzy lata po wprowadzeniu tego leku na rynek odkryto drugie, straszliwe oblicze talidomidu. Spostrzeżono, że zaczęło się rodzić niezwykle dużo dzieci z zanikiem kończyn. Podczas wnikliwego badania ustalono, że matki kalekich dzieci zażywały w czasie ciąży talidomid. Ostatecznie lek został wycofany z użycia, gdyż jak się później okazało, tylko jeden z izomerów optycznych – R-(+)-talidomid jest formą bezpieczną i może być z powodzeniem wykorzystywany jako lek wielofunkcyjny. Natomiast jego antymer S-(-)-talidomid miał działania teratogenne, to znaczy, że był czynnikiem wywołującym deformacje płodu [5]. Obecnie lek talidomid znowu wchodzi w użycie, jednak jest stosowany do innych celów oraz ze wzmożoną ostrożnością. W 1964 roku lekarz leczący trąd w Izraelu zalecił stosowanie talidomidu, jako leku uśmierzającego ból. Niespodziewanie okazało się, że lek łagodzi objawy tej bolesnej choroby. Od tego momentu talidomid zaczęto stosować do leczenia trądu. Talidomid gwałtownie dzieli komórki embrionalne, co z kolei sugeruje, że może on skutecznie hamować rozwój komórek nowotworowych. Obecnie uważa się, że trudno określić granicę pożytecznym zastosowaniom talidomidu. Może on być stosowany w leczeniu ponad 70 odmian raka, chorób skóry, układu pokarmowego i immunologicznego, a także może on być przydatny w leczeniu AIDS i gruźlicy [19].



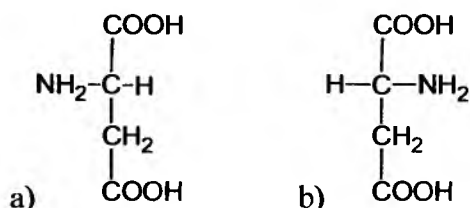
Rys.2.4.1. (a) S-(-)-Talidomid; (b) R-(+)- talidomid

W ostatnich latach coraz częściej zwraca się uwagę na to, aby leki w miarę możliwości były podawane w postaci pojedynczych enancjomerów. Jeśli chodzi o stosowanie leków za lata 1983-2002 w skali globalnej, to trzeba powiedzieć, że leki achiralne stanowiły 38% leków dostępnych na rynku farmaceutycznym, leki w postaci racemicznej z uwzględnieniem diastereoizomerów 23% i leki w postaci pojedynczych enancjomerów 39%. Natomiast, jeśli

weźmiemy pod uwagę lata 1991-2002 to stwierdzimy, że leki dostępne na rynku farmaceutycznym wykazują większą specyfikę działania, ze względu na większą liczbę leków w postaci pojedynczych enancjomerów (44%). Leki w postaci achiralnej stanowiły 42%, leki w postaci racemicznej z uwzględnieniem diastereoizomerów 14% [20]. Widać zatem wyraźnie, że tendencja do stosowania leków w postaci pojedynczych enancjomerów rośnie, co z kolei korzystnie wpływa na efektywność ich działania [21].

2.5. Metody datowania znalezisk archeologicznych na podstawie znajomości kinetyki enancjomeryzacji wybranych aminokwasów

Dogodnym punktem wyjścia do datowania skamielin jest fakt, iż wszystkie aminokwasy zawarte w białkach – z wyjątkiem glicyny – cechuje asymetria, mogą więc występować zarówno w formie lewo (L), jak i prawoskrętnej (D), natomiast aminokwasy zawarte w białkach organizmów żywych występują wyłącznie w konfiguracji L. Na podstawie szybkości racemizacji na przykład kwasu asparaginowego jesteśmy w stanie dokładnie określić wiek skamieliny zawierającej materiał organiczny [22,23]. Badania aminokwasów zawartych w skamielinach prowadzone od ponad pięćdziesięciu lat ujawniły, że pozostałości aminokwasów mogą w nich istnieć przez miliony lat. Próbkę zawierającą aminokwasy pozostawione w skamielinach ulegają powolnym przemianom z powodu różnic w stabilności aminokwasów, z których zbudowane są białka. Po śmierci organizmu zbudowanego z aminokwasów L zawartość aminokwasów L maleje aż do momentu, w którym ustali się równowaga pomiędzy nimi, a aminokwasami D. Stosunek aminokwasów D do aminokwasów L rośnie od momentu, w który nastąpiła śmierć organizmu. W przypadku aminokwasów zawierających jeden asymetryczny atom węgla równowaga ustala się wtedy, gdy stężenie aminokwasu L jest równe stężeniu aminokwasu D [24]. Taką mieszaninę nazwalismy już wcześniej mieszaniną racemiczną. Przykładem aminokwasu zawierającego jeden asymetryczny atom węgla może być wspomniany już wyżej kwas asparaginowy (rys.2.5.1).



Rys.2.5.1. (a) Kwas L-asparaginowy i (b) kwas D-asparaginowy [24]

Nie wszystkie aminokwasy mają tylko jedno centrum asymetrii i dlatego też równowaga nie zawsze ustala się w momencie zrównania się stężeń obydwu form. Często zdarza się tak, że równowaga jest przesunięta na korzyść jednej formy.

Można by zadać sobie pytanie, w jaki sposób materiał organiczny zawarty w skamielinach jest w stanie tak długo nie ulegać kompletnemu rozkładowi. Otóż najprawdopodobniej dzieje się tak dlatego, że skamieliny w jakiś trudny dziś do wyjaśnienia sposób „konserwują” cząsteczki aminokwasów i dzięki temu nie ulegają one spontanicznemu rozkładowi. Czynniki wpływające na szybkość racemizacji aminokwasów to temperatura, stężenie wody w środowisku, pH otoczenia (środowiska), ilość cząsteczek związanych względem niezwiązanych, wielkość cząsteczek związanych, bezpośredni kontakt z powierzchnią ziemi, obecność aldehydów, czy wreszcie właściwości buforujące środowiska.

2.6. Literatura

1. K. Pigoń, Z. Ruziewicz, *Chemia fizyczna*, PWN, Warszawa, 1980
2. N. M. Davies, *J. Chromatogr. B*, **691**, 229 (1997)
3. J. Sarfati, *Tech. J.*, **12**, 263 (1998)
4. I. W. Wainer, *Trends Anal. Chem.*, **12**, 153 (1993)
5. A. J. Macdermott, L. D. Barron, A. Brack, T. Buhse, A. F. Drake, R. Emerey, G. Gottarelli, J. M. Greenberg, R. Haberle, R.A. Hegstrom, K. Hobbs, D. K. Kondepudi, C. McKay, S. Moorbath, F. Raulin, M. Sandford, D. W. Schwartzman, W. H.-P. Thiemann, G.E. Tranter, J. C. Zarnecki, *Planet. Space Sci.*, **44**, 1441 (1996)
6. J. Bailey, *Acta Astronaut.*, **46**, 627 (2000)
7. J. D. Roberts, M. C. Caserio, *Chemia organiczna*, PWN, Warszawa, 1969; (a) str. 597; (b) str. 595; (c) str. 598; (d) str. 599; (e) str. 601; (f) str. 603
8. H. Urata, H. Shimizu, H. Hiroaki, D. Kohda, M. Akagi, *Biochem. Bioph. Res. Co.*, **309**, 79 (2003)
9. J-T Liu, R. H. Liu, *J. Biochem. Bioph. Meth.*, **54**, 115 (2002)
10. M. Nógrádi, *Stereochemia, podstawy i zastosowanie*, PWN, Warszawa, 1998
11. www.mlyniec.gda.pl
12. N. M. Maier, P. Franco, W. Lindner, *J. Chromatogr. A*, **906**, 3 (2001)
13. M. Avalos, R. Babiano, P. Cintas, J. L. Jiménez, J. C. Palacios, *Tetrahedron-Asymmetr.*, **11**, 2845 (2000)
14. N. Nandi, D. Vollhardt, *Thin Solid Films*, **433**, 12 (2003)
15. <http://efendi.ch.pwr.wroc.pl>
16. J. Lukša, D. Josić, B. Podobnik, B. Furlaan, M. Kremser, *J. Chromatogr. B* **693**, 367 (1997)
17. C. Mišl'anová, M. Hutta, *J. Chromatogr. B*, **797**, 91 (2003)
18. H. Y. Aboul-Enein, *J. Chromatogr. A*, **906**, 185 (2001)
19. R. Lewis, *Scientist*, **15**, 10 (2001)
20. H. Caner, E. Groner, L. Levy, *Drug Discov. Today*, **9**, 105 (2004)
21. A. Aumatell, A. Guttman, *J. Chromatogr. A*, **717**, 229 (1995)
22. S. Weiner, Z. Kustanovich, E. Gil-Av, W. Traub, *Nature*, **287**, 820 (1980)
23. M. Sinibaldi, G.A. Goodfriend, G. Barkay, S. Marchese, E. Gil-Av, *Geoarcheology*, **14**, 441 (1999)
24. R. H. Brown, *Origins*, **12**, 8 (1985)

3. Oddziaływania między związkami optycznie czynnymi a światłem spolaryzowanym

W rozdziale 2 stwierdzono, że dwa enancjomery danego związku różnią się jedynie skręcalnością płaszczyzny światła spolaryzowanego, skręcając tę płaszczyznę o taki sam kąt, ale w przeciwną stronę. Oznacza to, że jeden enancjomer skręca płaszczyznę światła spolaryzowanego w prawo (zgodnie z ruchem wskazówek zegara), co oznaczamy znakiem (+) przed nazwą cząsteczki, a drugi w lewo (przeciwnie do ruchu wskazówek zegara), co oznaczamy znakiem (-) przed nazwą cząsteczki [1]. Przyjrzyjmy się zatem, czym jest światło niespolaryzowane i spolaryzowane, i jakie są między nimi różnice. Otóż światło niespolaryzowane składa się z poprzecznych fal elektromagnetycznych drgających we wszystkich płaszczyznach położonych wzdłuż kierunku rozchodzenia się fali. W świetle niespolaryzowanym żadna z płaszczyzn nie jest wyróżniona. Poprzeczny charakter fal świetlnych został doświadczalnie potwierdzony przez Thomasa Younga w 1817 roku. O świetle mówi się również tak, jak o strumieniu cząstek, a strumień fotonów to także światło. Powstaje więc pewna, pozorna rozbieżność, gdyż natura światła jest złożona. Światło nie jest jedynie zwykłą falą, ani też jedynie strumieniem cząstek. W zależności od badanego zjawiska raz opisujemy je jako falę, a innym razem jako strumień cząstek. W takim przypadku mówimy o dualizmie korpuskularno-falowym światła.

Jeśli światło niespolaryzowane przepuścimy przez odpowiednią substancję zwaną polaryzatorem, to większość drgań zostanie wygaszona. Dzieje się tak dlatego, że polaryzator działa jak układ szczelin przepuszczających tylko te fale, których płaszczyzna drgań jest idealnie równoległa do szczeliny. Światło, w którym drgania zachodzą tylko w jednej, określonej płaszczyźnie nazywa się światłem spolaryzowanym. Dyfrakcja i interferencja mówią nam o falowej naturze światła, natomiast polaryzacja światła wskazuje na to, że są to fale poprzeczne [2].

Poniżej przedstawiono kilka metod, przy pomocy których możemy ze światła niespolaryzowanego wydzielić światło spolaryzowane [3]:

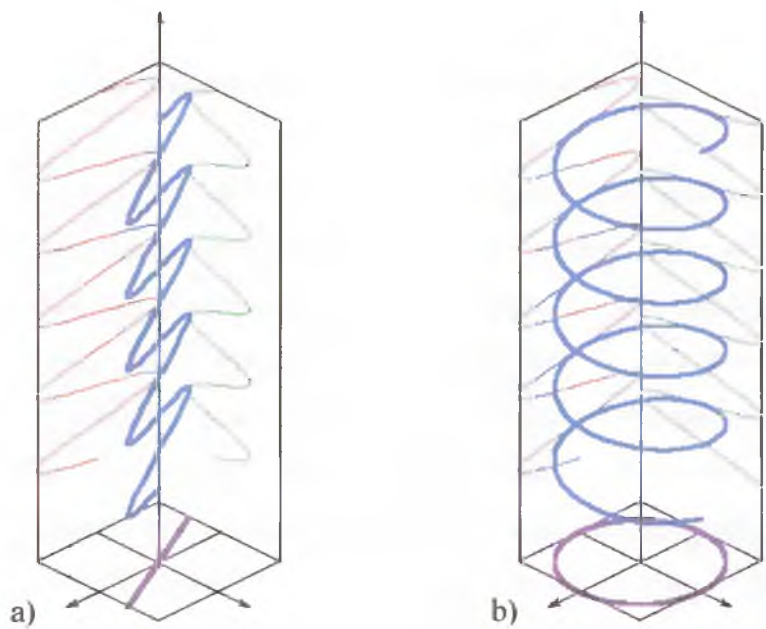
- ✓ *Polaroidy*. Są to płytki polaryzujące, wykonane z odpowiedniego materiału, w których zostaje wybrany pewien kierunek polaryzacji.
- ✓ *Polaryzacja przez odbicie*. Tą metodą można uzyskać światło częściowo lub całkowicie spolaryzowane. Doświadczalnie wykazano, że jeżeli na płytkę szklaną lub wykonaną z innego materiału skierujemy wiązkę światła niespolaryzowanego, to wiązka ta w trakcie odbicia ulega polaryzacji.

- ✓ *Polaryzacja przez załamanie.* Niektóre kryształy wykazują zdolność tzw. podwójnego załamania. Pojedyncza wiązka światła rozszczepia się na dwie wiązki, z których jedna to tzw. promień zwyczajny, a druga to tzw. promień nadzwyczajny. Doświadczalnie ustalono, że światło po przejściu przez wspomniany już wcześniej kryształ, charakteryzujący się anizotropią optyczną, nabiera nowych właściwości. Wówczas promień zwyczajny i nadzwyczajny są spolaryzowane liniowo.
- ✓ *Selektywna emisja.* Metoda ta polega na zastosowaniu źródła takiej fali, która wykonuje drgania tylko w jednym kierunku.
- ✓ *Selektywne pochłanianie.* Jeśli drgania fali w jednym kierunku są tłumione, a w prostopadłym do niego nie są, to fala rozchodząc się w tym ośrodku wygasi drgania w jednym kierunku, czyli ulegnie polaryzacji.

Za skręcanie płaszczyzny światła spolaryzowanego przez dany związek chemiczny odpowiedzialne jest wzajemne oddziaływanie fali świetlnej i elektronów jego cząsteczek. Większość cząsteczek nie skręca płaszczyzny światła spolaryzowanego, gdyż działania chaotycznie rozłożonych cząsteczek wzajemnie się znoszą. Istnieją jednak takie struktury przestrzenne, wspomniane już wcześniej, które bez względu na ułożenie w przestrzeni skręcają światło spolaryzowane w tę samą stronę. W takim przypadku działania wszystkich cząsteczek w roztworze sumują się, co w efekcie końcowym prowadzi do czynności optycznej.

Cząsteczkę czynną optycznie można wykryć tylko dzięki chiralnemu otoczeniu. W tym miejscu należy zadać sobie pytanie, jak to się dzieje, że światło spolaryzowane liniowo (rys.3.0.1a; wtedy, gdy wektor drgań pola elektrycznego znajduje się w jednej, stałej płaszczyźnie) ma zdolność różnicowania izomerów optycznych. Odpowiedź na to pytanie jest następująca: światło spolaryzowane liniowo należy traktować jak złożenie dwóch fal świetlnych spolaryzowanych kołowo (rys.3.0.1b; wtedy, gdy wektor drgań pola elektrycznego wykonuje obroty razem z przemieszczającą się falą). Jeden z wierzchołków fali wektora natężenia pola elektrycznego wykreśla w przestrzeni helisę prawoskrętną (gr. *hélikos* = skręt, śruba, linia śrubowa leżąca na powierzchni walca lub stożka, która przecina tworzące tych brył pod stałym, ściśle określonym kątem [4]), natomiast drugi helisę lewoskrętną. Helisy o takich samych wymiarach, ale o przeciwnych zwrotach nie dają się na siebie nałożyć [5]. Zatem mamy dwie fale chiralne, co z kolei prowadzi do różnego ich spowalniania przez

cząsteczki substancji optycznie aktywnej. Ostatecznie następuje skręcenie płaszczyzny światła spolaryzowanego liniowo.



Rys.3.0.1. Polaryzacja światła; a) liniowa, b) kołowa [6]

Posługując się współczynnikami załamania światła spolaryzowanego kołowo w prawo i w lewo, wynoszącymi odpowiednio n_R i n_L , możemy wyznaczyć kąt skręcenia α . Zależność ta jest przedstawiona przy pomocy poniższego równania [3]:

$$\alpha = \frac{\pi}{\lambda}(n_L - n_R)d \quad [\text{radian}] \tag{3.0.1}$$

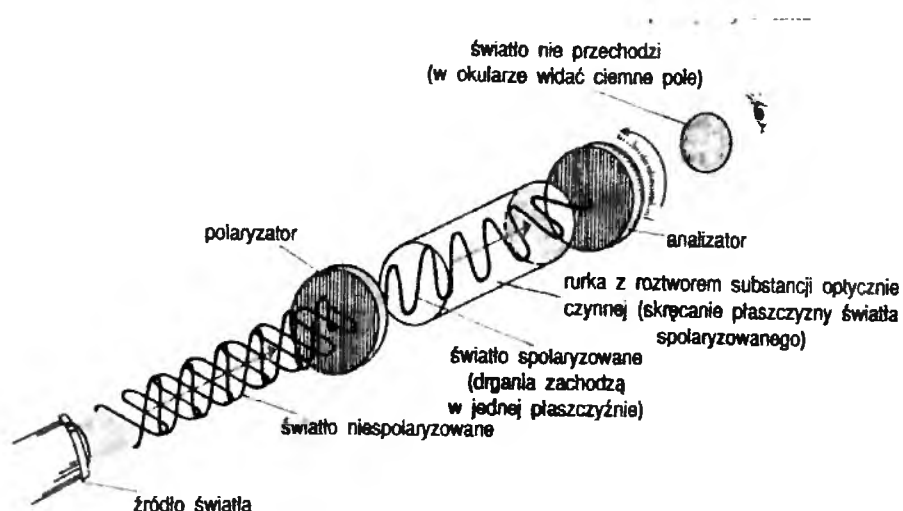
gdzie λ to mierzona w próżni długość fali światła przechodzącego, a d to długość drogi przebytej przez spolaryzowaną wiązkę światła. Fala światła spolaryzowanego kołowo w prawo porusza się w danym ośrodku z prędkością v_R , a fala światła spolaryzowanego kołowo w lewo porusza się z prędkością v_L . Jeśli prędkość v_R jest inna niż prędkość v_L , to wtedy mówimy o tzw. dwójłomności kołowej ośrodka. Substancję nazywamy prawoskrętną, jeśli $v_R > v_L$ ($n_R < n_L$, czyli $\alpha > 0$). Natomiast substancję lewoskrętną opisuje następująca zależność $v_R < v_L$ ($n_R > n_L$, czyli $\alpha < 0$) [1].

Związki czynne optycznie charakteryzuje jeszcze jedna cecha, a mianowicie konfiguracja. W rozdziale 2 stwierdzono, czym jest konfiguracja i jak ją się wyznacza. W tym

miejscu należy przypomnieć, że konfiguracja nie ma żadnego przełożenia na określoną skręcalność optyczną. Tak więc konfiguracja L nie może być utożsamiana ze skręcalnością ujemną, a konfiguracja D ze skręcalnością dodatnią.

3.1. Skręcalność optyczna, jej pomiar oraz sposoby wyrażania

Skręcalność optyczna jest zdolnością danej substancji do skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego podczas przechodzenia wiązki światła przez roztwór badanej substancji. W celu wyznaczenia skręcenia płaszczyzny światła spolaryzowanego należy użyć przyrządu zwanego polarymetrem. Polarymetr jest zbudowany w taki sposób, że wzdłuż jednej linii są ustawione źródło światła, polaryzator, przezroczyste naczynie zawierające badaną substancję, drugi polaryzator zwany analizatorem i okular do obserwowania wygaszania wiązki światła (rys.3.1.1). Przed przystąpieniem do badania próbki polaryzatory ustawiamy w taki sposób, aby wiązka światła przechodziła przez oba. W takim układzie światło jest widoczne w okularze. Następnie w polarymetrze pomiędzy obu polaryzatorami umieszczamy próbkę skręcającą światło spolaryzowane, w wyniku czego nie zobaczymy wiązki światła w okularze, gdyż nie przejdzie ono przez drugi polaryzator. Przekręcenia drugiego polaryzatora tak, aby światło znów trafiło na szczelinę spowoduje, że w okularze zobaczymy promień świetlny. Kąt, o jaki musieliśmy przekręcić drugi polaryzator nazywamy kątem skręcania światła spolaryzowanego. Jest on wartością charakterystyczną dla danego związku. Jego wartość zależy od stężenia roztworu w próbce i dlatego należy porównywać roztwory o takich samych stężeniach. Wartość skręcalności może zależeć także od długości użytego promieniowania, dlatego też najczęściej jako źródło promieniowania stosuje się lampy sodowe, które emitują charakterystyczne żółte światło o długości fali $\lambda=589$ nm. Opisana powyżej metoda wyznaczania skręcalności optycznej, a co za tym idzie i stężenia badanej substancji w roztworze, nosi nazwę polarymetrii [2].



Rys.3.1.1. Schemat budowy polarymetru [7]

Aby można było porównywać wartości skręcalności optycznej różnych substancji, a także na tej podstawie prowadzić analizę ilościową i jakościową, wprowadzono wielkość zwaną skręcalnością właściwą $[\alpha]$. Skręcalność właściwą określa się jako kąt skręcenia płaszczyzny światła spolaryzowanego przez roztwór zawierający 1 gram substancji w 1 cm³ przy przejściu światła przez warstwę roztworu o grubości 10 centymetrów. Zależność ta jest przedstawiona poniższym równaniem [1]:

$$[\alpha]_{\lambda}^T = \frac{\alpha}{dc} \quad (3.1.1)$$

gdzie α oznacza obserwowany doświadczalnie kąt skręcenia wyrażony w stopniach, d - to grubość warstwy roztworu (wyrażona w dm), przez którą przechodzi światło spolaryzowane, c - to stężenie badanej substancji, podane w gramach na 1 cm³ roztworu, natomiast λ i T oznaczają wybraną do pomiaru długość fali świetlnej i temperaturę. Skręcalność właściwa zależy także od rodzaju rozpuszczalnika.

Dla czystych substancji równanie (3.1.1) przyjmuje następującą postać [1]:

$$[\alpha]_{\lambda}^T = \frac{\alpha}{d\rho} \quad (3.1.2)$$

gdzie ρ oznacza gęstość badanej substancji.

Oprócz skręcalności właściwej wyznacza się także skręcalność molową $[\varphi]$. Skręcalność molową wyznaczamy z następującego wzoru [1]:

$$[\varphi]_{\lambda}^T = [\alpha]_{\lambda}^T \frac{M}{100} \quad (3.1.3)$$

gdzie M jest to masa molowa badanej substancji. Jak wynika z równania (3.1.3), skręcalność molowa jest iloczynem skręcalności właściwej i $1/100$ masy molowej związku optycznie czynnego. Kąt skręcenia płaszczyzny światła spolaryzowanego charakteryzuje daną substancję i jest jej specyficzną cechą, a w przypadku roztworów związków czynnych optycznie zależy także od ich stężenia w roztworze.

Znajomość wartości skręcalności optycznej dla czystych enancjomerów jest często stosowana do określenia czystości enancjomerycznej, czyli molowej przewagi jednego z enancjomerów.

3.2. Dyspersja skręcalności optycznej

Dyspersja skręcalności optycznej (ang. optical rotatory dispersion, ORD) [5] opisuje zależność skręcalności optycznie czynnej substancji od długości fali światła spolaryzowanego. Dyspersja skręcalności optycznej nazywana jest też czasami, choć mniej poprawnie, dyspersją rotacyjną lub dyspersją obrotową. Jeśli posługujemy się widmami w zakresach dostatecznie odległych od pasm absorpcji elektronowej substancji, to dyspersję skręcalności optycznej możemy opisać przy pomocy poniższego równania [1]:

$$[\alpha]^T = \sum_{i=1}^{i=n} \frac{K_i}{\lambda^2 - \lambda_{0i}^2} \quad (3.2.1)$$

gdzie λ jest długością fali światła przechodzącego przez substancję, λ_{0i} to długość fali dla maksimum i -tego (wpływającego na aktywność optyczną) pasma absorpcyjnego badanej substancji, zaś K_i to stała charakterystyczna dla tego pasma. Powyższe równanie można uprościć, uwzględniając wpływ tylko jednego pasma absorpcji, dzięki czemu równanie (3.2.1) przyjmuje postać zaproponowaną przez Drudego w 1906 roku [1]:

$$[\alpha]^r = \frac{K}{\lambda^2 - \lambda_0^2} \quad (3.2.2)$$

Dyspersję kąta skręcenia płaszczyzny polaryzacji światła w obszarach oddalonych od pasm absorpcyjnych danej substancji opisuje prawo Biota [8]:

$$[\alpha] \cong \lambda_0^{-2} \quad (3.2.3)$$

3.3. Dichroizm kołowy

W 1896 roku Cotton badał zjawiska występujące w obszarze aktywnych pasm absorpcyjnych optycznie czynnych substancji i w bezpośrednim ich sąsiedztwie, więc podstawowe, zaobserwowane zjawisko zostało nazwane efektem Cottona. Mianowicie Cotton zaobserwował występowanie tzw. dichroizmu kołowego.

Dichroizm kołowy (ang. circular dichroism, CD) to zjawisko polegające na zróżnicowanej absorpcji światła spolaryzowanego [9]. Ilościowo jest ono zdefiniowane poprzez wielkość fizyczną zwaną eliptycznością ψ . Zależność ta jest przedstawiona przy pomocy poniższego równania [5]:

$$\psi = \frac{\pi}{\lambda} (k_M - k_P) \quad (3.3.1)$$

gdzie k_M i k_P to współczynniki absorpcji składowych światła spolaryzowanych kołowo w lewo i w prawo. Eliptyczność jest wyrażana w radianach, przypadających na jednostkę długości.

Dichroizm kołowy jest ściśle związany ze skręcalnością właściwą. W obszarze aktywnych pasm absorpcyjnych i w bezpośrednim ich sąsiedztwie skręcalność właściwa zmienia się bardzo ostro wraz z długością padającej fali świetlnej λ , niezgodnie z przedstawionym wcześniej równaniem (3.2.1). Zjawisko takie określamy nazwą anomalnej dyspersji skręcalności optycznej.

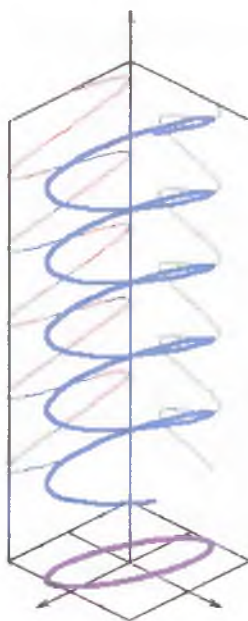
Efekt Cottona może przyjmować znak dodatni lub ujemny. O dodatnim znaku efektu Cottona mówimy wtedy, gdy $\varepsilon_L > \varepsilon_R$ (ε_L i ε_R to współczynniki ekstynkcji światła spolaryzowanego kołowo w lewo i w prawo). Wtedy to skręcalność właściwa osiąga minimum przy $\lambda < \lambda_0$, a przy $\lambda > \lambda_0$ przechodzi przez maksimum (λ_0 to długość fali

odpowiadająca wierzchołkowi aktywnego pasma absorpcji). Z ujemnym znakiem efektu Cottona spotykamy się wtedy, gdy $\varepsilon_L < \varepsilon_R$, a skręcalność właściwa osiąga maksimum przy $\lambda < \lambda_0$, natomiast minimum przy $\lambda > \lambda_0$.

W 1909 roku Natanson sformułował regułę, zgodnie z którą jeżeli po długofalowej stronie pasma absorpcyjnego światło kołowo spolaryzowane w prawo jest słabiej absorbowane niż w lewo ($\varepsilon_L > \varepsilon_R$), a współczynnik załamania światła spolaryzowanego w prawo jest mniejszy niż w lewo ($n_R < n_L$), to skręcalność właściwa jest większa od zera.

Dla rozmaitych pasm absorpcyjnych danej substancji znak efektu Cottona bywa różny. Efekty przeciwnego znaku są zawsze związane z tym samym pasmem absorpcyjnym dla dwu enancjomerów.

Światło o długości fali bliskiej λ_0 spolaryzowane pierwotnie liniowo, po przejściu przez substancję wykazującą dichroizm kołowy staje się teraz spolaryzowane eliptycznie (rys.3.3.2) (koniec wektora pola elektrycznego zatacza elipsy, gdyż różnica faz nie jest równa wielokrotności 90°), jako skutek różnego pochłaniania składowych o przeciwnej polaryzacji kołowej [1].



Rys.3.3.2. Polaryzacja światła eliptyczna [6]

Dyspersja skręcalności optycznej i dichroizm kołowy to dwie techniki pozwalające uzyskać odpowiedź dotyczącą konfiguracji absolutnej chiralnej molekuly [10]. Dichroizm kołowy jest techniką często używaną do oceny konformacji białek w roztworze [11].

3.4. Literatura

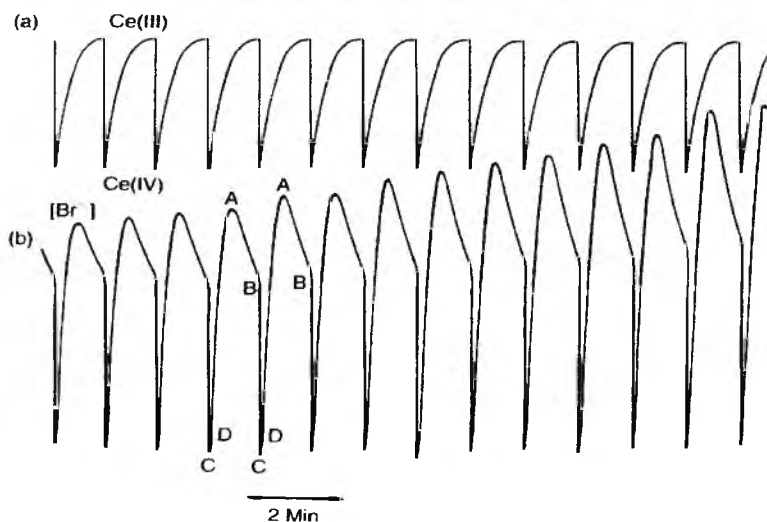
1. K. Pigoń, Z. Ruziewicz, Chemia fizyczna, PWN, Warszawa, 1980
2. D. Halliday, R. Resnick, Fizyka, PWN, Warszawa, 1980
3. M. A. Herman, A. Kalestyński, L. Widomski, Podstawy fizyki, PWN, Warszawa, 1997
4. C. Jura, H. Krzanowska, Leksykon biologiczny, Wiedza Powszechna, Warszawa, 1992
5. M. Nógrádi, Stereochemia, podstawy i zastosowanie, PWN, Warszawa, 1998
6. www.wikipedia.pl
7. www.interklasa.pl
8. B. M. Jaworski, A. A. Dietlaf, Fizyka, poradnik encyklopedyczny, PWN, Warszawa, 1997
9. H. G. Brittain, J. Pharm. Biomed. Anal., **17**, 933 (1998)
10. P. L. Polavarapu, D. K. Chakraborty, Chem. Phys., **240**, 1 (1999)
11. S. Y. Tetin, F. G. Prendergast, S. Y. Venyaminov, Anal. Biochem., **321**, 183 (2003)

4. Reakcje oscylacyjne

Podczas przebiegu procesów chemicznych stężenia substancji wyjściowych najczęściej maleją wraz z upływem czasu, a stężenia produktów rosną. Nieco inaczej sprawa przedstawia się, jeśli chodzi o reakcje oscylacyjne. Reakcje oscylacyjne to niezwykle i często efektywnie przebiegające procesy, w czasie trwania których niektóre z biorących w nich udział reagentów ulegają niemonotonicznym, a więc oscylacyjnym zmianom stężenia w czasie, co często (przynajmniej dla układów jednorodnych) dotyczy substancji przejściowych pomiędzy substratami i produktami. Znaczenie reakcji oscylacyjnych trudno przecenić, ponieważ stanowią one m.in. jedną z zasadniczych cech żywych organizmów [1]. Jednakże znaczenie reakcji oscylacyjnych to nie tylko zagadnienia mechanizmów reakcji chemicznych czy biochemicznych, gdyż analogiczne zachowanie i podobny, a zatem uniwersalny opis matematyczno – fizyczny dotyczy wielu zjawisk z innych dziedzin, takich jak niezmatematyzowane dotychczas działy biologii, a nawet dyscyplin pozornie bardzo od chemii odległych: ekologii, socjologii czy psychologii. Dzieje się tak dlatego, że reakcje o regularnym, okresowym, ale także niezwykle złożonym, wręcz nieprzewidywalnym, czyli chaotycznym przebiegu w czasie stanowią wspólną cechę wielu układów odległych od stanów równowagi, a zatem takich, w których toczą się intensywne, nieodwracalne przemiany fizyczne lub chemiczne [2]. Do takich układów zaliczane są przede wszystkim organizmy żywe i ich zespoły, naszych ludzkich organizmów – rzecz jasna – nie wyłączając, a także pewne fizyczne i chemiczne układy nieożywione. Obserwacje prowadzące do opracowania uniwersalnego, matematycznego modelu tych zjawisk mogą okazać się jednym z kluczowych etapów rozwoju nauki, usiłującej zrozumieć mechanizm powstawania życia przez samoorganizację materii nieożywionej. Opis taki mógłby również wyjaśnić wiele zjawisk samoorganizacji w układach nieożywionych i to o bardzo różnej skali – od spójnie zachowujących się zespołów atomów i cząsteczek w probówce, po obiekty w skali kosmicznej, takie jak stabilne układy planetarne, galaktyki i gromady galaktyk.

Badania naukowe nad procesami wykazującymi niemonotoniczność przebiegu w czasie lub przestrzeni sięgają XIX wieku [3]. Po raz pierwszy reakcje oscylacyjne zostały zauważone podczas obserwacji układów niejednorodnych (heterogenicznych), jak np. w przypadku periodycznego wytrącania osadów żelaza (w tzw. zjawiskach Liesegang), oscylacji prądu elektrycznego w czasie elektrolitycznego utleniania różnych metali, czy „pulsującego serca rtęciowego”. Jednak za najśłynniejszą reakcję oscylacyjną uważa się odkrytą w latach pięćdziesiątych ubiegłego stulecia reakcję Bielousowa – Żabotyńskiego [4-

6]. Reakcja ta polega na utlenianiu kwasu organicznego (np. cytrynowego lub malonowego) przy pomocy bromianu w obecności katalitycznej pary jonowej redoks, np. Ce(IV)/Ce(III) .



Rys.4.0.1. Wykres przedstawiający typowy wynik eksperymentalny w reakcji Bielousowa – Żabotyńskiego. Oscylacje przedstawione jako potencjał (a) elektrody platynowej i (b) elektrody bromkowej (obie w odniesieniu do kalomelu) [7]

4.1. Zasady termodynamiki a reakcje oscylacyjne

Od momentu pojawiania się reakcji oscylacyjnych zjawiska te próbowano z różnym powodzeniem wyjaśniać, pozostając przy tym w zgodzie z obowiązującymi teoriami, a zwłaszcza z klasycznie pojmowaną II zasadą termodynamiki w ujęciu Boltzmanna. Wydawało się bowiem, że zasada ta przeczy spontanicznemu powstawaniu jakichkolwiek uporządkowań w układach jednorodnych, w trakcie procesów nieodwracalnych. Według Boltzmanna procesy te powinny wykazywać działanie wyłącznie strukturodestrukcyjne. Pojęcie uporządkowania powiązał Boltzmann z entropią, wyprowadzoną wcześniej przez Clausiusa. Uporządkowanie oznacza tu nie tyle geometryczną charakterystykę stanu układu, co sposób, w jaki jego energia została rozłożona pomiędzy dostępne rodzaje ruchów (translacyjnych, rotacyjnych, oscylacyjnych). Boltzmann twierdził, że obserwowane w przyrodzie struktury ulegają stałej degradacji. Przebiegają one od stanu mniej prawdopodobnego o większym uporządkowaniu do stanu bardziej prawdopodobnego o mniejszym uporządkowaniu. Ilościową miarą postępu procesu jest wartość entropii, funkcji zawsze rosnącej dla układu izolowanego i dla całej przyrody. Boltzmann uważał, że

spontaniczne tworzenie struktur musiałoby prowadzić do zmniejszenia entropii, czyli ostatecznie do obalenia II zasady termodynamiki.

II zasada termodynamiki nakazuje, aby łączna entropia układu i jego otoczenia (czyli tzw. uniwersum) w trakcie jakiegokolwiek rzeczywistego procesu nie malała, a ściślej pozostawała stała w procesach odwracalnych, rosła zaś w nieodwracalnych, osiągając w stanie równowagi pewną maksymalną wartość dla danych warunków [8].

$$dS_{\text{uniw}} = dS_{\text{ukł}} + dS_{\text{ot}} \geq 0 \quad (4.1.1)$$

gdzie dS_{uniw} to łączna entropia uniwersum, czyli układu i jego otoczenia, $dS_{\text{ukł}}$ to entropia układu, a dS_{ot} to entropia otoczenia.

W takim ujęciu entropia samego układu nie musi rosnąć w trakcie każdego nieodwracalnego procesu, może nawet maleć, jeśli tylko entropia otoczenia może równocześnie wzrosnąć w stopniu co najmniej kompensującym spadek entropii układu. Dlatego też mogą powstawać struktury równowagowe, czyli tzw. uporządkowania istniejące w stanie równowagi z otoczeniem. W warunkach stałej temperatury T , zmiany entropii układu muszą spełniać nierówność:

$$S \geq Q_{\text{el}}/T_{\text{ukł}} \quad (4.1.2)$$

gdzie $T_{\text{ukł}}$ jest temperaturą układu, a Q_{el} jest elementarną ilością energii, wymienianej na sposób ciepła między układem i otoczeniem, przy czym nierówność odnosi się do procesów nieodwracalnych, a równość do procesów odwracalnych [8]. Zgodnie z obecnym stanem wiedzy można powiedzieć, że istnieje tylko jeden przypadek, gdy entropia układu musi rosnąć w trakcie procesu nieodwracalnego. Przypadek ten dotyczy układów izolowanych termicznie, mechanicznie i w każdy inny sposób od otoczenia. Układ taki musi zatem posiadać stałą energię wewnętrzną. Na skutek tego postulowany przez II zasadę termodynamiki wzrost entropii uniwersum jest rezultatem jedynie entropii samego układu, zgodnie z podanym niżej równaniem [8]

$$dS_{\text{uniw}} = dS_{\text{ukł}} \geq 0 \quad (4.1.3)$$

Zatem w układzie izolowanym jakiegokolwiek uporządkowania nie mogą powstawać spontanicznie i żyć dowolnie długo, gdyż oznaczałoby to spadek entropii uniwersum. W tym

miejscu należy jednak zwrócić uwagę na to, że układem może być obiekt, w obrębie którego mogą wciąż przebiegać różne procesy. Brak kontaktu z otoczeniem powoduje jednak nieuchronne podążanie układu do stanu równowagi, z którego spontanicznie nie może się wyłonić żadne nowe uporządkowanie. W przypadku, gdy układ jest otwarty, to uporządkowania takie jak oscylacje mogą pojawiać się w nim i trwać, jeśli jednocześnie towarzyszą temu procesy o nieodwracalnym charakterze. Dzieje się tak dlatego, że procesy nieodwracalne charakteryzują się rozpraszaniem, czyli tzw. dyssypacją energii, co z kolei oznacza jej wymianę pomiędzy układem i otoczeniem na sposób ciepła, z której wynika wzrost entropii uniwersum. Jeżeli ten wzrost, wynikający z dyssypacji energii, jest większy niż spadek entropii towarzyszący równoczesnemu powstawaniu jakichkolwiek struktur, to pomimo ich wytworzenia globalny wzrost entropii nadal pozostaje, co jest zgodne z II zasadą termodynamiki.

Klasyccy termodynamicy nie dostrzegli takiego sposobu pogodzenia II zasady termodynamiki z tworzeniem uporządkowań w warunkach procesów nieodwracalnych, z powstawaniem struktur nierównowagowych. Dopiero belgijski termodynamik rosyjskiego pochodzenia Ilya Prigogine nazwał liczną klasę takich nierównowagowych uporządkowań, powstających dostatecznie daleko poza stanem równowagi, strukturami dyssypatywnymi. Chemiczne reakcje oscylacyjne zaliczane są więc do chemicznych struktur dyssypatywnych. Jednocześnie należy powiedzieć, że pojęcie struktur dyssypatywnych jest szersze niż równowagowych, gdyż obejmuje ono nie tylko uporządkowania przestrzenne, ale także i czasowe, np. synchroniczne zmiany zachowań całego układu w czasie, typowe dla homogenicznych chemicznych reakcji oscylacyjnych.

Struktury dyssypatywne można ogólnie podzielić na: przestrzenne, czasowo – przestrzenne oraz czasowe. Zgodnie z obecnym stanem wiedzy, drogę do struktur dyssypatywnych, poczynwszy od stanu równowagi, można przedstawić w następujący sposób. Minimalne odchylenie układu od stanu równowagi odpowiada zakresowi liniowych procesów nieodwracalnych. W momencie ustania bodźców termodynamicznych, układ powróci monotonicznie do stanu równowagi, charakteryzującego się minimalną, niezerową produkcją entropii. Jeśli będą spełnione założenia termodynamiki liniowej, jakiejkolwiek zmiany natężenia bodźców termodynamicznych spowodują powstanie odpowiednich innych stanów stacjonarnych, a wówczas stan układu pozostaje w obrębie gałęzi termodynamicznej. Z nieco inną sytuacją spotykamy się wówczas, gdy bodźce termodynamiczne odchylają układ od stanu równowagi na tyle, że liniowy opis termodynamiczny przestaje mieć zastosowanie. W efekcie układ może opuścić gałąź termodynamiczną, tzn. dotychczasowy zbiór stanów

stacjonarnych utraci stabilność. Wówczas układ może przejść do jakościowo nowego zachowania. Opisana powyżej jakościowa zmiana w zachowaniu układu nazywa się bifurkacją. Bardzo ważną bifurkacją jest utrata stabilności przez stan stacjonarny na rzecz stanu oscylacyjnego. Takie przejście nosi nazwę bifurkacji Hopfa [9]. Niegasnące oscylacje powstające w układzie otwartym mogą być zrozumiane jako zjawiska nieliniowe, powstające poza obszarem stabilności liniowych stanów stacjonarnych. Wystąpienie bifurkacji i powstanie odpowiedniej struktury dyssypatywnej (np. oscylacji) jest bezpośrednio związane z niespełnieniem kryterium stabilności stanów z gałęzi termodynamicznej.

Aby odpowiedzieć na pytanie, czym jest kryterium stabilności nierównowagowych stanów stacjonarnych należy najpierw rozważyć stan równowagi układu izolowanego, który jest stanem stabilnym, charakteryzującym się pewną maksymalną entropią S_e . Jeśli teraz doprowadzimy do zakłócenia tego stanu, zaburzającego np. energię wewnętrzną układu o wartość δE , to spowodowaną tym zakłóceniem reakcję entropii układu można opisać równaniem, które jest rozwinięciem funkcji S w szereg potęgowy:

$$S = S_{równ} + \left(\frac{\partial S}{\partial E} \right)_{równ} \cdot \delta E + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial^2 S}{\partial E^2} \right)_{równ} \cdot (\delta E)^2 + \dots \quad (4.1.4)$$

gdzie $S_{równ}$ to entropia w stanie równowagi, $(\partial S / \partial E)_{równ}$ to pochodna entropii po energii wewnętrznej układu w stanie równowagi, $(\partial^2 S / \partial E^2)$ to druga pochodna entropii po energii wewnętrznej układu w stanie równowagi, itd. Z uwagi na ekstremalną wartość S w stanie równowagi człon $(\partial S / \partial E)_{równ}$ jest równy zeru [9]. Dlatego też stabilność układu jest wyznaczona przez człony wyższego rzędu. Sprowadzając powyższą zależność do wyrażenia drugiego rzędu otrzymujemy następujące, uproszczone równanie:

$$S = S_{równ} + \frac{1}{2} \delta^2 S \quad (4.1.5)$$

Dla zapewnienia stabilności stanu równowagi, zgodnie z warunkiem maksimum entropii układu izolowanego w stanie równowagi, człon równania $(\delta^2 S)_{równ}$ powinien mieć wartość ujemną [9]. Powyższe rozważania są prawdziwe tylko dla stanu równowagi i w jego bliskim (liniowym) otoczeniu. W ogólnym przypadku procesów nierównowagowych, pochodna $\delta^2 S$ po czasie nie jest związana z całkowitą produkcją entropii. Wielkością, która to

zagadnienie opisuje jest, jak wykazali Glansdorff i Prigogine, tzw. nadmiarowa produkcja entropii, wynikająca z zaburzeń rozważanego stanu stacjonarnego:

$$\frac{1}{2} \frac{\partial}{\partial t} \delta^2 S = \sum_{i=1}^n \delta J_i \delta X_i \quad (4.1.6)$$

gdzie δJ i δX oznaczają odchylenia przepływów i sił termodynamicznych od wartości charakteryzujących badany stan stacjonarny [9].

W powyższym równaniu w ogólnym przypadku nieliniowych procesów nieodwracalnych nadmiarowa produkcja entropii, wyrażona przez prawą stronę tego równania, nie ma jednoznacznie określonego znaku. Jeśli prawa strona równania jest większa lub równa lewej dla każdego punktu czasowego od momentu wprowadzenia zaburzenia, to rozważany stan stacjonarny jest stabilny. Jest to tzw. kryterium Prigogine’a i Glansdorffa [9]:

$$\sum_{i=1}^n \delta J_i \delta X_i \geq 0 \quad (4.1.7)$$

Powyższa nierówność jest spełniona w otoczeniu stanu równowagi i w niewielkim od niego odchyleniu (w nieliniowym zakresie termodynamiki). Jeśli nierówność ta przyjmuje wartość ujemną, nie oznacza to automatycznie niestabilności stanu. Jest to jedynie warunek konieczny, a nie dostateczny wystąpienia niestabilności.

Jeśli nie jest spełnione kryterium stabilności Glansdorffa – Prigogine’a, to w układzie mogą wystąpić bifurkacje, czyli jakościowe zmiany sposobu jego zachowania (np. ze stabilnego stanu stacjonarnego może wyłonić się stan oscylacyjny). O takim układzie mówimy wtedy, że opuścił gałąź termodynamiczną, czyli zespół stanów, opisanych termodynamiką liniową. Z bifurkacjami mamy do czynienia zawsze wtedy, gdy układ jest niestabilny względem zaburzeń. Niestety, żaden układ nie jest wolny od takich perturbacji, gdyż zawsze występują w nim fluktuacje, czyli losowe, lokalne odchylenia parametrów stanu od wartości średnich. Często spotykamy się z taką sytuacją, że fluktuacje zostają wzmocnione, co z kolei prowadzi do powstania nowego uporządkowania – struktury dyssypatywnej. Opisany proces nazywa się porządkowaniem przez fluktuacje, natomiast jego skutkiem jest zjawisko samoorganizacji. Samoorganizacja występuje najczęściej spontanicznie wówczas, gdy układ o odpowiedniej charakterystyce wewnętrznej zostanie dostatecznie oddalony od stanu równowagi. Chemiczne reakcje oscylacyjne zaliczane są do

zjawisk nieliniowych, gdyż są one odpowiedzialne za tworzenie nowego, dynamicznego zachowania układu.

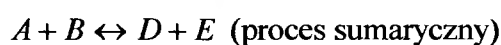
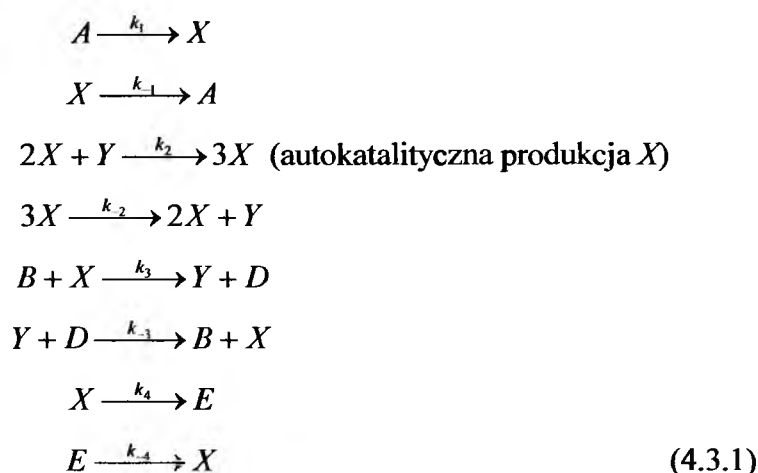
4.2. Przyczyny występowania reakcji oscylacyjnych

Reakcje oscylacyjne należą zwykle do reakcji bardzo złożonych i nie do końca poznanych. Dlatego też nie jest sprawą prostą przedstawienie matematycznego opisu zmian zachodzących w badanym układzie. W tym miejscu należy sobie zadać pytanie, jakie to kryteria muszą spełniać procesy fizykochemiczne, aby ich przebieg mógł przybrać charakter oscylacyjny. Zgodnie z obecnym stanem wiedzy kryteria te przedstawiają się w sposób następujący [9]:

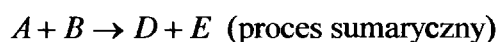
- ✓ Parametry opisujące układ muszą być odległe od stanu równowagi. Wynika z tego, że muszą one mieć dużą wartość siły napędowej reakcji, której miarą w warunkach izotermiczno – izochorycznych lub izotermiczno – izobarycznych jest ujemna swobodna energia Helmholtza ΔF ($F = E - TS$), lub swobodna entalpia reakcji Gibbsa, ΔG ($G = H - TS$), gdzie E jest energią wewnętrzną, H – entalpią, T – temperaturą, S – entropią.
- ✓ Musi być spełniona zasada nieliniowości charakterystyki dynamicznej układu. Chodzi tutaj o to, by równania kinetyczne reakcji były nieliniowe, tzn. aby zawierały człony, wyrażające np. iloczyn stężeń dwóch lub więcej form przejściowych lub stężenie pojedynczej formy podniesione do potęgi różnej od jedności.
- ✓ Jest rzeczą pożądaną, aby w mechanizmie reakcji istniały etapy (pętle) sprzężeń zwrotnych, niekiedy o odpowiednio opóźnionym działaniu.

4.3. Teoretyczny model Brukselatora z członem dyfuzyjnym

Brukselator jest jednym z bardziej znanych abstrakcyjnych modeli procesów oscylacyjnych w układach dyssypatywnych. Nazwa tego modelu wywodzi się od tzw. szkoły brukselskiej, czyli zespołu pracującego pod kierunkiem I. Prigogine'a. Brukselator jest oparty na pionierskiej pracy A. Turinga z 1952 roku, która zawierała następujący mechanizm reakcji odwracalnych [9]:



Brukselator jest uproszczonym modelem Turinga, gdzie wszystkie etapy są nieodwracalne, natomiast ich stałe szybkości są równe jedności: $k_1=k_2=k_3=k_4=1$



Przedstawiony model operuje dwiema formami przejściowymi (X i Y), aczkolwiek wśród reakcji elementarnych pojawia się etap dwucząsteczkowy i etap trózcząsteczkowy. Bezpośrednim skutkiem wyższej rzędowości reakcji elementarnych jest to, że w równaniach kinetycznych pojawiają się człony o silnej nieliniowości. Jeśli założymy, że stężenia form A , B , D i E mechanizmu (4.3.2) są stałe w czasie, to zmiany stężeń substancji przejściowych X i Y można opisać przy pomocy następującego układu równań różniczkowych:

$$\begin{aligned}
\frac{d[X]}{dt} &= [A] + [X]^2[Y] - ([B] + 1)[X] \\
\frac{d[Y]}{dt} &= [B][X] - [X]^2[Y]
\end{aligned} \tag{4.3.3}$$

W wyniku przyrównania do zera wartości lewych stron powyższych równań otrzymujemy parametry stanu stacjonarnego:

$$\begin{aligned} [A] + [X]_{st}^2 [Y]_{st} - ([B] + 1)[X]_{st} &= 0 \\ [B][X]_{st} - [X]_{st}^2 [Y]_{st} &= 0 \end{aligned} \quad (4.3.4)$$

Rozwiązując układ równań (4.3.4) dochodzimy do wniosku, że Brukselator wykazuje tylko jeden stan stacjonarny, określony przez stężenia substratów:

$$[X]_{st} = [A] \quad [Y]_{st} = [B]/[A] \quad (4.3.5)$$

Stan ten jest stabilny tylko wówczas, gdy spełniona jest następująca relacja między stężeniami A i B :

$$[B] < [A]^2 + 1 \quad (4.3.6)$$

Jeśli zmiana stężenia B prowadzi do osiągnięcia wartości krytycznej $[B]_{kr} = [A]^2 + 1$, to wówczas następuje tzw. bifurkacja Hopfa, czyli utrata stabilności przez stan stacjonarny. Zatem jeśli w praktyce spełniona jest zależność:

$$[B] > [A]^2 + 1, \quad (4.3.7)$$

to wówczas obserwuje się zupełnie nowe zachowanie układu – stabilne oscylacje stężeń X i Y .

Opisany powyżej mechanizm dotyczył wyłącznie układów jednorodnych, czyli pozbawionego gradientu stężeń, gdzie każde z rozważanych stężeń było wyłącznie funkcją czasu, o przebiegu jednakowym w każdym elemencie przestrzennym roztworu. Zgola odmiennie przedstawia się sytuacja, jeśli założymy niejednorodny rozkład substancji w przestrzeni (x, y, z), co sprawia, że stężenia są funkcją wielu zmiennych: $C(x, y, z, t)$. Sprzężenie kinetyki reakcji chemicznych z dyfuzją reagentów może prowadzić do zdestabilizowania jednorodnego stanu stacjonarnego i powstania uporządkowań przestrzennych – stacjonarnych i niestacjonarnych (fal chemicznych). Spostrzeżenie struktur stacjonarnych jest zasługą Turinga i dlatego też nazywa się je dziś strukturami Turinga. Z kolei prowadząca do nich utrata stabilności jednorodnego stanu stacjonarnego – bifurkacją

Turinga. Uwzględniając dyfuzję w równaniach kinetycznych (4.3.3) należy do nich dodać człon wynikający z II prawa Ficka. Rozpatrując najprostszy przypadek dyfuzji zależnej od jednej współrzędnej przestrzennej r , układ równań przyjmuje następującą postać:

$$\begin{aligned}\frac{\partial[X]}{\partial t} &= [A] + [X]^2[Y] - ([B] + 1)[X] + D_X \frac{\partial^2[X]}{\partial r^2} \\ \frac{\partial[Y]}{\partial t} &= [B][X] - [X]^2[Y] + D_Y \frac{\partial^2[Y]}{\partial r^2}\end{aligned}\quad (4.3.8)$$

gdzie D_X i D_Y oznaczają współczynniki dyfuzji form X i Y , a pochodne przybierają charakter cząstkowy, uwzględniający zależność $[X]$ i $[Y]$ od więcej niż jednej zmiennej. Układ równań (4.3.8) można rozwiązać jedynie numerycznie, co z kolei wymaga określenia warunków brzegowych, tzn. ograniczeń narzuconych na zachowanie form X i Y na krańcach reaktora. Jeśli założymy, że substancje X i Y nie opuszczają reaktora, to wtedy otrzymujemy zerowe gradienty stężeń X i Y na granicach obszaru reaktora, czyli dla $r = 0$ i $r = 1$.

$$\left[\frac{d[X]}{dr} \right]_{r=0} = \left[\frac{d[Y]}{dr} \right]_{r=0} = \left[\frac{d[X]}{dr} \right]_{r=1} = \left[\frac{d[Y]}{dr} \right]_{r=1} = 0 \quad (4.3.9)$$

Następnie stosując liniową analizę stabilności układu (4.3.8) definiuje się nowe zmienne γ i ϑ , określające różnicę między wartościami aktualnymi $[X]$ i $[Y]$, a ich wartościami w stanie stacjonarnym:

$$\begin{aligned}\gamma &= [X] - [X]_{st} = [X] - [A] \\ \vartheta &= [Y] - [Y]_{st} = [Y] - [B]/[A]\end{aligned}\quad (4.3.10)$$

Uwzględniając nowe zmienne, układ równań (4.3.8) przyjmuje postać:

$$\begin{aligned}\frac{\partial\gamma}{\partial t} &= \gamma^2\vartheta + \frac{[B]}{[A]}\gamma^2 + 2[A]\gamma\vartheta + [B]\gamma - \gamma + D_X \frac{\partial^2\gamma}{\partial r^2} \\ \frac{\partial\vartheta}{\partial t} &= -\gamma^2\vartheta - 2[A]\gamma\vartheta - \frac{[B]}{[A]}\gamma^2 - [B]\gamma - [A]^2\vartheta + D_Y \frac{\partial^2\vartheta}{\partial r^2}\end{aligned}\quad (4.3.11)$$

Po wprowadzeniu linearyzacji otrzymujemy równania opisujące stan stacjonarny:

$$\begin{aligned}\frac{\partial \gamma}{\partial t} &= ([B] - 1)\gamma + [A]^2 \vartheta + D_x \frac{\partial^2 \gamma}{\partial r^2} = 0 \\ \frac{\partial \vartheta}{\partial t} &= -[B]\gamma - [A]^2 \vartheta + D_y \frac{\partial^2 \vartheta}{\partial r^2} = 0\end{aligned}\tag{4.3.12}$$

Nowe zmienne γ , ϑ zachowują takie same warunki brzegowe, jak zmienne oryginalne $[X]$ i $[Y]$. Dodatkowo zaburzenia stanu stacjonarnego powinny przyjmować wartość zerową na granicy obszaru: $\gamma(r=0, t) = \vartheta(r=0, t) = \gamma(r=l, t) = \vartheta(r=l, t) = 0$. Rozwiązanie ogólne (γ, ϑ) układu (4.3.12) dla takich warunków brzegowych przyjmuje postać: $e^{\omega t} \cos[n\pi r/l]$, gdzie $n = 0, 1, 2, \dots$. Jeśli podstawimy te wyrażenia do układu (4.3.12), to wówczas otrzymamy następujący układ równań algebraicznych:

$$\begin{aligned}\left[\omega - [B] + 1 + D_x \frac{n^2 \pi^2}{l^2} \right] \gamma - [A]^2 \vartheta &= 0 \\ [B]\gamma + \left[\omega + [A]^2 + D_y \frac{n^2 \pi^2}{l^2} \right] \vartheta &= 0\end{aligned}\tag{4.3.13}$$

Układ ten ma niezerowe rozwiązania pod warunkiem zerowej wartości wyznacznika. Utrata stabilności stacjonarnych rozwiązań Brukselatora z dyfuzją wymaga spełnienia następującego warunku:

$$[B] \geq 1 + [A]^2 + (D_x + D_y) \frac{n^2 \pi^2}{l^2},\tag{4.3.14}$$

który jest rozszerzeniem warunku (4.3.7) o człon związany z dyfuzją reagentów.

Brukselator z dyfuzją umożliwia wymodelowanie następujących rodzajów zachowania układu: 1) synchronicznych zmian stężeń X i Y w całej przestrzeni reaktora, odpowiadających powstawaniu stabilnego cyklu granicznego, 2) stacjonarnego periodycznego rozkładu stężeń X i Y w reaktorze, czyli wspomnianych już struktur Turinga, 3) biegnących, periodycznych frontów falowych i 4) chaotycznych frontów falowych. Ponadto Brukselator może być również wykorzystywany do modelowania struktur przestrzennych, np. na dwuwymiarowej szachownicy, której każde pole zawiera osobny oscylator sprzężony dyfuzyjnie z

oscylatorami sąsiednimi. Po wprowadzeniu lokalnego zaburzenia stężenia jednej z form, zachowanie takich układów sprzężonych komórek oscylacyjnych może wykazywać istotne podobieństwo do schematu podziału komórek biologicznych.

4.4. Literatura

1. J. Faimon, *Geochim. Cosmochim. Ac.*, **60**, 2901 (1996)
2. K. Asaka, K. Oguro, *Electrochim. Acta*, **45**, 4517 (2000)
3. A. Pechenkin, *Stud. Hist. Philos. M. P.* **33**, 269 (2002)
4. P. Ruoff, *Physica D*, **84**, 204 (1995)
5. S. Fujieda, Y. Mori, A. Nakazawa, Y. Mogami, *Adv. Space Res.*, **28**, 537 (2001)
6. I. Hanazaki, Y. Mori, T. Sekiguchi, G. Rábai, *Physica D*, **84**, 228 (1995)
7. P. Gray, S. K. Scott, *Chemical oscillations and instabilities. Non – linear chemical kinetics*, Clarendon Press, Oxford, 1994
8. K. Pigoń, Z. Ruziewicz, *Chemia fizyczna*, PWN, Warszawa, 1980
9. M. Orlik, *Reakcje oscylacyjne porządek i chaos*, WNT, Warszawa, 1996

5. Żele fizyczne i zjawisko żelowania

5.1. Chemia supramolekularna

Po raz pierwszy terminu „chemia supramolekularna” użył Jean-Marie Lehn [1] w odniesieniu do układów ponadcząsteczkowych. Jednak to nie prace Lehna, lecz pionierskie prace Pedersena [1] z 1967 roku nad syntezą eterów koronowych można uważać za początek chemii supramolekularnej. Najważniejsze w chemii supramolekularnej są oddziaływania międzycząsteczkowe, jakimi są wiązania wodorowe oraz inne oddziaływania międzycząsteczkowe (aromatyczne, van der Waasa, kulombowskie, itp.). To one są odpowiedzialne za tworzenie, istnienie, funkcje i transformacje układów supramolekularnych. Każda reakcja, w której biorą udział przynajmniej dwie cząsteczki chemiczne jest w swoim przebiegu związana z oddziaływaniami międzycząsteczkowymi, więc jest reakcją przebiegającą na poziomie supramolekularnym.

Bardzo ważna jest możliwość tworzenia przez poszczególne cząsteczki połączeń inkluzyjnych, polegających na dopasowaniu się do wklęsłości lub wypukłości poszczególnych struktur, selektywność ich tworzenia oraz kierunkowy wpływ oddziaływań międzycząsteczkowych na kształtowanie się poszczególnych agregatów molekuł. Na właściwości układów molekularnych wywierają wpływ poszczególne molekuly, które w fazie czystej mogą wykazywać zgoła odmienne właściwości. Często decydujący o właściwościach całego układu molekularnego jest sposób upakowania cząsteczek w strukturze trójwymiarowej.

Chemia supramolekularna podejmuje próbę modelowania molekularnego. Dobierając odpowiednio parametry cząsteczek wyjściowych można budować i syntezować nowe związki o pożądanых właściwościach. Należy podkreślić, że możliwości tworzenia nowych struktur w obrębie chemii supramolekularnej są praktycznie nieograniczone i że w dużej mierze zależą one od pomysłowości eksperymentatora.

Jeśli chodzi o obszar działania chemii supramolekularnej, to wydaje się, że obejmuje on dwa zasadnicze kierunki: jednym z nich są badania układów modelowych, występujących w systemach biologicznych (np. modele enzymów, nieorganiczne helisy itp.), a drugim są badania z zakresu chemii materiałowej (np. nanostruktury, materiały magnetyczne, półprzewodniki i nadprzewodniki organiczne, materiały do celów analitycznych itp.).

Osiągnięcia chemii supramolekularnej mogą być wykorzystywane na wiele rozmaitych sposobów. Poniżej przedstawiono kilka praktycznych zastosowań [1]:

- ✓ Medycyna i diagnostyka medyczna;
- ✓ Elektronika, telekomunikacja i informatyka;
- ✓ Chemia analityczna;
- ✓ Technologia metali;
- ✓ Ochrona środowiska;
- ✓ Alternatywne źródła energii.

5.2. Żele – pojęcie i ogólne sposoby klasyfikacji

Żel jest czymś, co prawie każdy rozpozna, mimo, że w wielu przypadkach wydaje się on być trudnym do jednoznacznego określenia. W codziennym życiu bardzo często spotykamy się z żelami, chociażby w przemyśle spożywczym czy kosmetycznym. Pomimo tego, że każdy wie, jak wygląda żel, ustalenie ogólnej definicji żelu jest stosunkowo kłopotliwe. Żelu nie da się opisać w paru słowach [2]. Dorothy Jordon Lloyd tak pisała w latach 20-tych ubiegłego stulecia o żelu: „żel łatwiej rozpoznać, niż zdefiniować” [3]. Pierwszą próbę zdefiniowania żelu pojął Flory. Według Flory’ego żelem nazywamy substancję spełniającą poniższe kryteria [4]:

- ✓ Substancja musi mieć strukturę ciągłą o mikroskopijnych wymiarach, która będzie trwała podczas trwania eksperymentu analitycznego;
- ✓ Substancja powinna posiadać stałe (tj. niezmiennie) właściwości reologiczne.

Na podstawie tych dwóch, bardzo ogólnych kryteriów można stwierdzić, że bardzo wiele układów może być zdefiniowanych jako żele. Przykładowymi żelami mogą być roztwory polimerów, micelle i mikroemulsje.

Inny sposób zdefiniowania żelu zaproponowali Gelbart i Ben-Schaul, którzy postulowali utworzenie wspólnej grupy substancji określanej mianem „ciekłych kompleksów” (tzw. płyny złożone), do której zaliczyli wszystkie typy mieszanin, emulsji i zawiesin. Ponadto sugerowali oni istnienie wspólnej cechy płynów złożonych, a mianowicie występowanie mezoskopowej skali długości, pozwalającej częściowo określić właściwości tych substancji. Płyny złożone muszą mieć wymiary zawierające się między wielkością prostych cząsteczek, a wielkością struktur wielkocząsteczkowych [5].

Zjawisko żelowanie może następować w wyniku koagulacji. Koagulacja jest procesem polegającym na łączeniu się cząsteczek fazy rozproszonej w większe agregaty tworzące fazę ciągłą, charakteryzującą się nieregularną strukturą.

Żele możemy podzielić na:

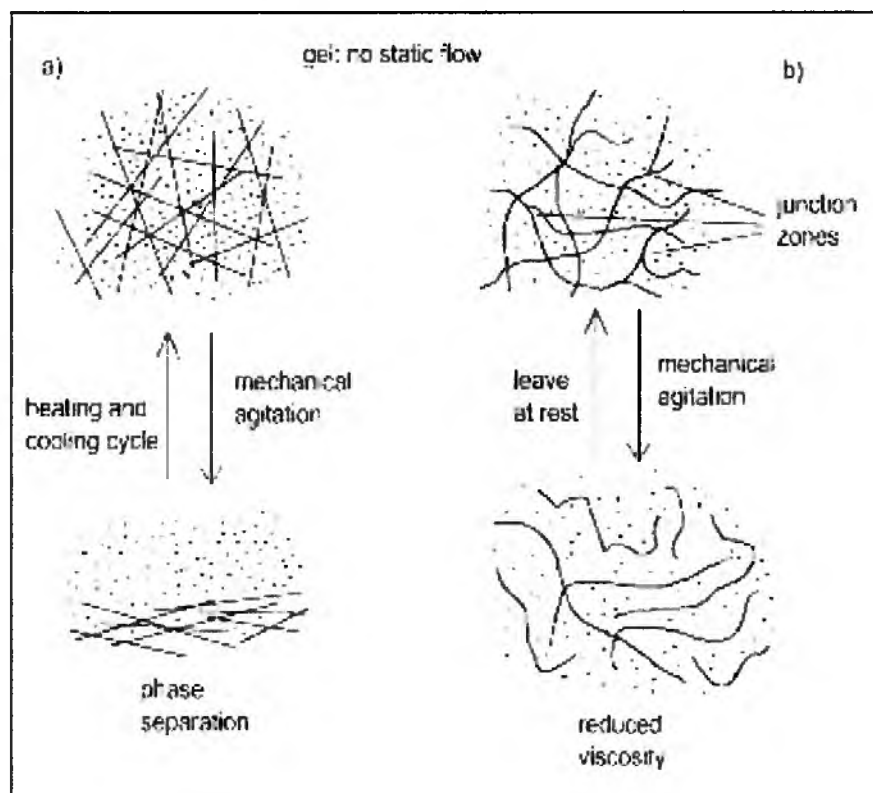
- ✓ Chemiczne i fizyczne;
- ✓ Nieorganiczne i organiczne.

W żelach chemicznych cała faza stała sieci jest ustabilizowana przy pomocy wiązań kowalencyjnych. Usieciowane polimery są dobrym przykładem takiego typu żeli. Mogą się one kurczyć bądź rozkurczać poprzez dodanie lub usuwanie rozpuszczalnika, pod wpływem temperatury i różnicy ciśnienia. Różne chemiczne żele nieorganiczne takie jak krzemionka, są także dobrym przykładem żeli chemicznych. Powstawanie tych żeli jest nieodwracalne.

5.3. Żelowanie fizyczne jako specyficzny rodzaj polimeryzacji bez udziału wiązań chemicznych

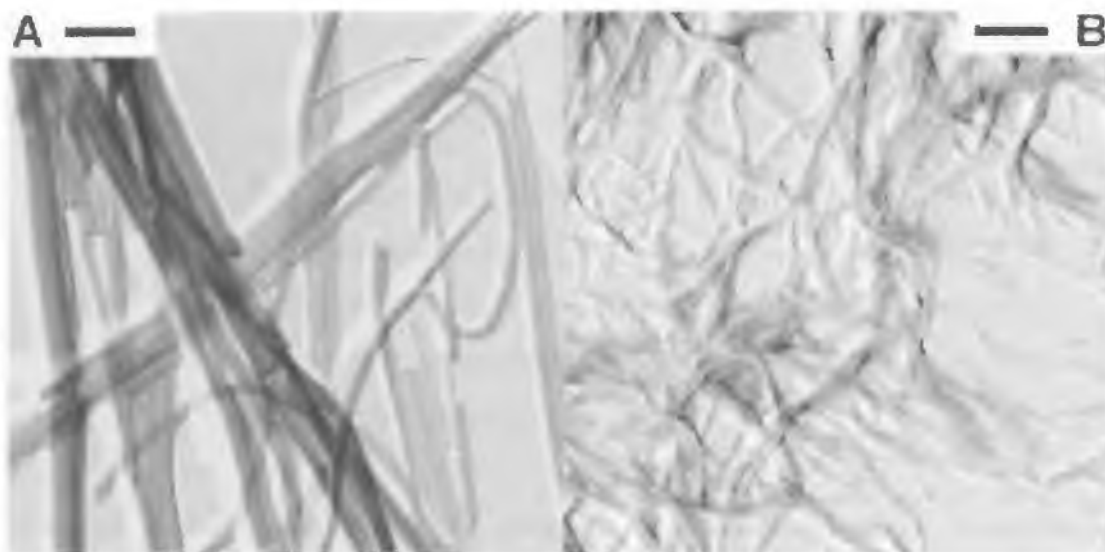
Innym rodzajem żeli są żele fizyczne. W przypadku formowania żeli fizycznych wpływ rozpuszczalnika jest znacznie ważniejszy, niż w przypadku formowania żeli chemicznych. Chociaż w wodzie oddziaływania hydrofobowe odgrywają znaczącą rolę w powstawaniu agregatów, to w przypadku rozpuszczalników organicznych oddziaływania te są nieobecne lub nie stanowią głównego czynnika odpowiedzialnego za agregację [6]. Oznacza to, że w przypadku pojawienia się agregatów małych cząsteczek organicznych dominują innego rodzaju oddziaływania. Oddziaływania te mogą być bardzo różne, poczynając od wiązań wodorowych i aromatycznych oddziaływań między elektronami π po jonowe lub koordynacyjne wiązania organometaliczne. Żelowanie może opierać się także na oddziaływaniach dyspersyjnych Londona. Nie mniej ważną rolę odgrywają zdolności do rozpuszczania i wpływy entropowe. Ponieważ niekowalencyjne oddziaływania są słabsze od oddziaływań kowalencyjnych, ogólnie żele fizyczne wykazują charakterystyczną zdolność odwracalnego przechodzenia z postaci żelu w stan rozpuszczony w zależności od temperatury. Oddziaływania niekowalencyjne nadają strukturze żelu sztywność i stabilność. Rysunek 5.3.1 przedstawia oddziaływania, jakie mogą występować w żelach. Agregaty tworzące strukturę żelu wyglądają jak porozrzucane igły (rys.5.3.1a i 5.3.2a). Pomiędzy poszczególnymi igłami dochodzi do mechanicznego kontaktu. Żel odpowiadający powyższemu opisowi jest nietrwały, ponieważ wytrząsanie lub energiczne mieszanie

proceeds to phase separation, and in consequence to destruction of the gel structure. This process is irreversible, as long as the system is not heated, and then cooled.



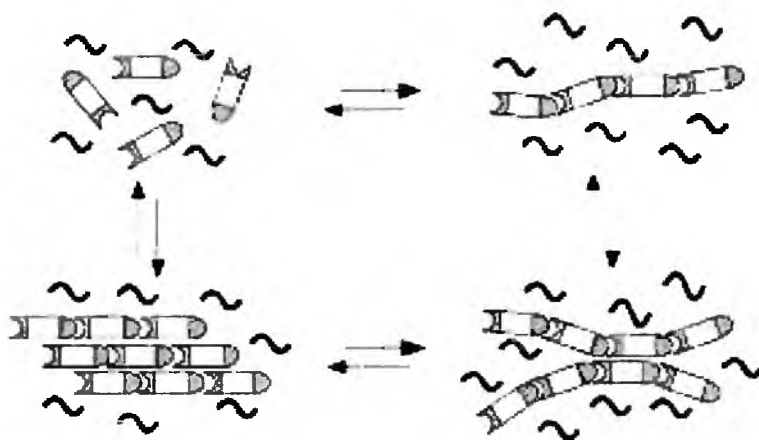
Rys.5.3.1. Różnice w zachowaniu się żelu (a) powstałego w wyniku mechanicznego kontaktu oraz (b) żelu o właściwościach tiksotropowych [2]

Rysunek 5.3.1b przedstawia odmienną sytuację. W przypadku takiego żelu włókna nie są sztywne, lecz przeplatają się oraz dzielą, tworząc nowe włókna lub przyłączając się do innych włókien. Taki żel nie ulega rozpadowi na skutek wytrząsania lub energicznego mieszania, lecz pozostaje nadal żelem, jakkolwiek o zmniejszonej lepkości. O takim żelu mówimy, że posiada właściwości tiksotropowe (tikotropia czyli rozpadanie się węzłów). Układ charakteryzujący się właściwościami tiksotropowymi, pozostawiony przez pewien czas w stanie spoczynku, powraca znowu w stan żelu.



Rys.5.3.2. Zdjęcie żelu (a) powstałego w wyniku mechanicznego kontaktu oraz żelu (b) o właściwościach tiktotropowych pod mikroskopem elektronowym [2]

W celu ustalenia molekularnego kryterium żelowania należy brać pod uwagę oddziaływania międzycząsteczkowe, które są schematycznie przedstawione na rysunku 5.3.3.



Rys.5.3.3. Kluczowe etapy przedstawiające proces tworzenia się żelu [2]

W procesie tworzenia się żelu najpierw oddziałują ze sobą cząsteczki żelatora tworząc agregaty, które powinny wzrastać w jednym kierunku. Po utworzeniu przez żelatory długich włókien, niektóre części tych włókien oddziałują z innymi włóknami, tworząc rozbudowaną strukturę sieci. Jednak oddziaływania międzycząsteczkowe nie powinny być zbyt wysokoenergetyczne, gdyż mogłoby to doprowadzić do rozdzielenia się faz i krystalizacji.

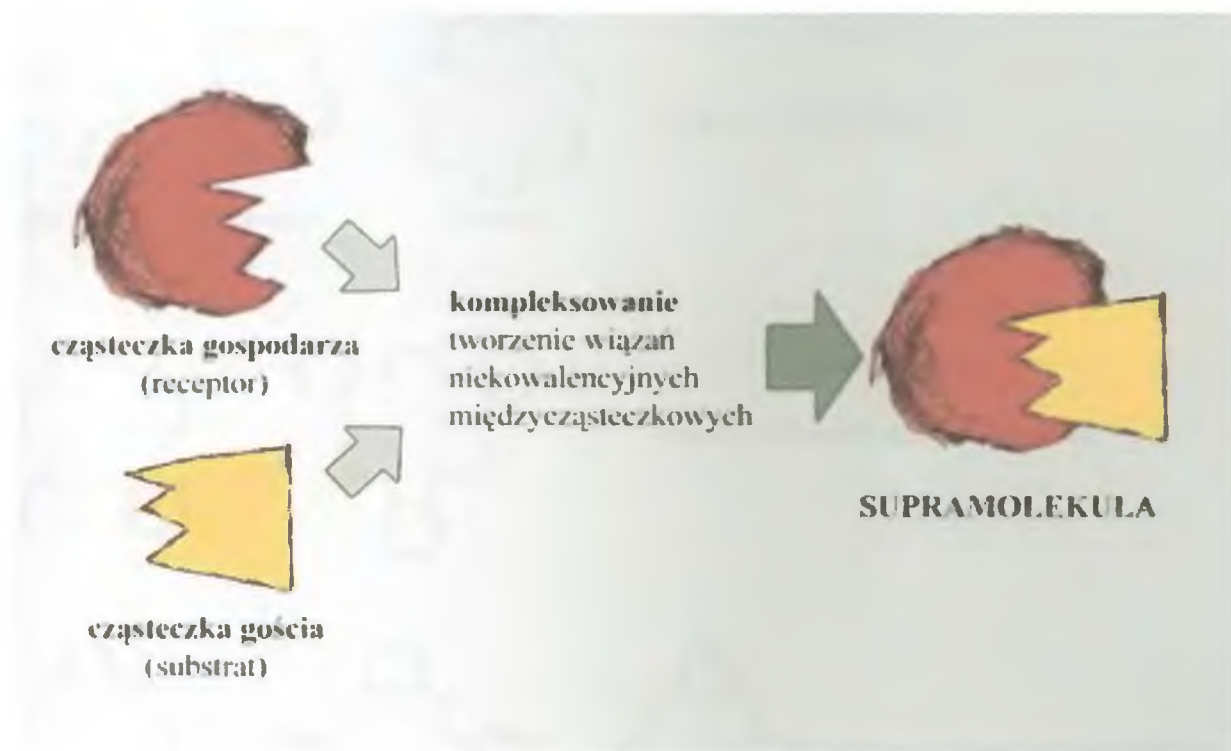
Przykładowymi żelatorami są:

- ✓ Cukry;
- ✓ Amidy;
- ✓ Związki powierzchniowo czynne w postaci kationów podwójnych z anionami winianowymi jako przeciwjonami;
- ✓ Pochodne antracenu i antrachinonu oraz pochodne steroidowe;
- ✓ Alkany zawierające jeden heteroatom i czwartorzędowe sole amonu z łańcuchami alifatycznymi.

5.4. Związki niskocząsteczkowe i ich predyspozycje strukturalne do występowania w charakterze związków – „gospodarzy”

W obrębie chemii supramolekularnej oprócz interesującego zjawiska powstawania żeli fizycznych, równie ciekawe jest tworzenie związków inkluzyjnych, które w określonych warunkach również mogą żelować. Przyjrzyjmy się zatem, jakie warunki muszą spełniać związki, aby mogły one występować w charakterze związków „gospodarzy” i co sprawia, że w określonych warunkach tworzą żele.

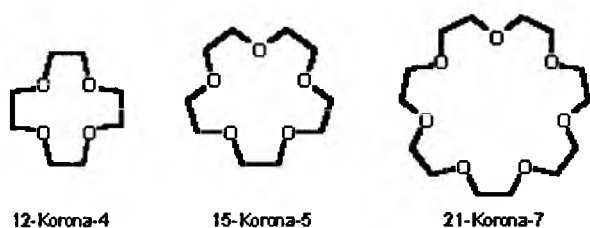
Do związków niskocząsteczkowych mogących występować w charakterze związków „gospodarzy” zaliczamy m.in.: etery koronowe, cyklodekstryny i kaliksareny. Związek kompleksowy składa się z dwóch lub więcej odrębnych molekuł tworzących razem określoną strukturę. Tworzenie związków kompleksowych typu „gospodarz” – „gość” polega na sterycznym dopasowaniu cząsteczki kompleksowanej i kompleksującej. Związek kompleksowy typu „gospodarz” – „gość” składa się przynajmniej z jednej cząsteczki związku „gospodarza” i z jednej cząsteczki związku „gościa”. „Gospodarz” jest zdefiniowany jako molekula organiczna lub jon, który posiada miejsca aktywne, mające możliwość przyłączania innych związków. „Gościem” z kolei jest molekula lub jon, który ma zdolność tworzenia połączeń z „gospodarzem”. Przeważnie jest tak, że związek będący „gospodarzem” jest większy od związku będącego „gościem” [7]. Sytuacja ta jest schematycznie przedstawiona na poniższym rysunku (rys.5.4.1):



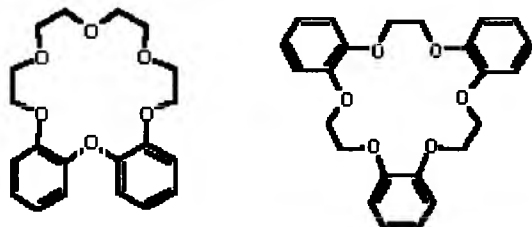
Rys.5.4.1. Schematyczne przedstawienie tworzenia się kompleksu typu „gospodarz” – „gość” [8]

Związki „gospodarzy” charakteryzują się m.in. tym, że wielkość wnęki, przy pomocy której tworzą one połączenia ze związkami „gości” może być dowolnie modyfikowana. Jest zatem sprawą oczywistą, że związki „gospodarzy” są zazwyczaj naprzód starannie projektowane, a następnie otrzymywane syntetycznie [7].

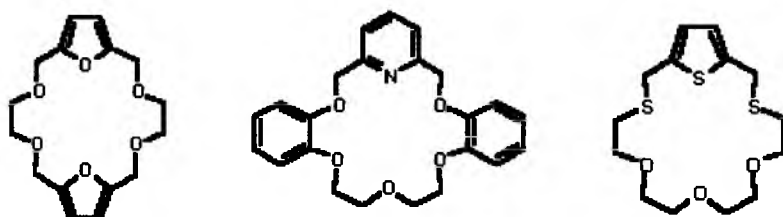
Etery koronowe posiadają wymienione wyżej właściwości i dlatego są zaliczane do grupy związków mogących występować w charakterze „gospodarzy”. Poniżej przedstawiono kilka przykładów eterów koronowych i ich modyfikacji [8]:



Piersńienie różnej wielkości



Różne podstawniki elektronodonorowe



Różne podstawniki heterocykliczne
i heteroatomowe

Rys.5.4.2. Etery koronowe i ich modyfikacje [8]

Porównanie wielkości wnęki (średnica) dla poszczególnych eterów koronowych przedstawia się następująco [7]:

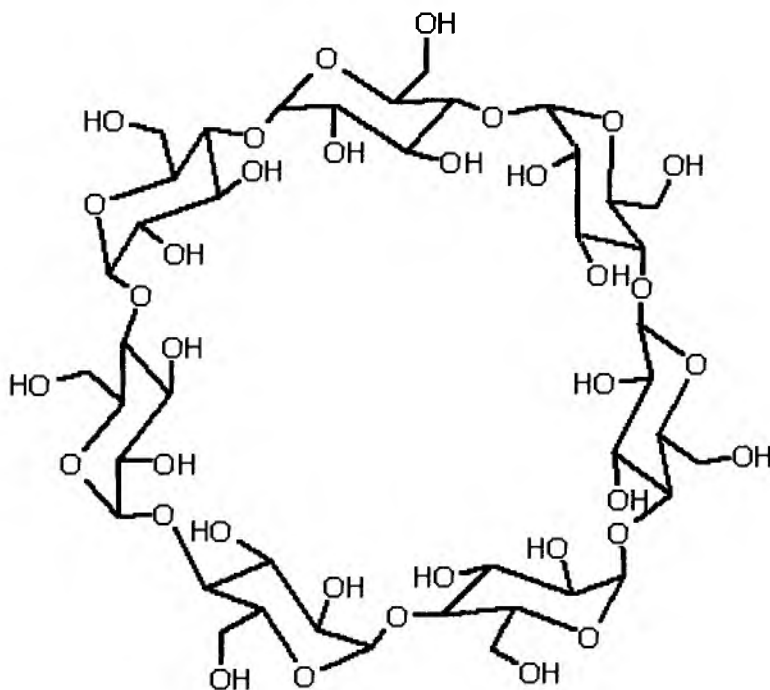
- 12 – korona – 4: 1.2-1.5 Å;
- 15 – korona – 5: 1.7-2.2 Å;
- 21 – korona – 7: 3.4-4.3 Å

Wielkości tych wnęk odpowiadają następującym kationom: Li^+ : 1.36 Å, Na^+ : 1.90 Å i Cs^+ : 3.38.

Kolejną grupą związków zdolną do występowania w charakterze związków „gospodarzy” są cyklodekstryny. Cyklodekstryny są cyklicznymi oligosacharydami. α -Cyklodekstryna składa się z sześciu, β -cyklodekstryna z siedmiu, a γ -cyklodekstryna z ośmiu jednostek glukopiranozowych. Cyklodekstryny tworzą struktury cylindryczne z grupami hydroksylowymi przy obu brzegach. Wnęki cyklodekstryn są stosunkowo niepolarne i posiadają następujące wymiary:

- ✓ α -Cyklodekstryna – średnica wewnętrzna wynosi ok. 5.0 Å, a głębokość ok. 8.0 Å.
- ✓ β -Cyklodekstryna – średnica wewnętrzna wynosi ok. 6.0 Å, a głębokość ok. 8.0 Å.
- ✓ γ -Cyklodekstryna – średnica wewnętrzna wynosi ok. 8.0 Å, a głębokość ok. 8.0 Å.

W bardzo licznych przypadkach cyklodekstryny znalazły zastosowanie do rozdzielania chromatograficznego enancjomerów i w syntezie asymetrycznej. Z drugiej strony istnieją pewne ograniczenia w stosowaniu cyklodekstryn, wynikające z obecności wielu grup hydroksylowych, które sprawiają problem z ich selektywnym działaniem. Poza tym wnętrza cyklodekstryn są trwałe tylko w roztworze zasadowym lub obojętnym, co w pewien sposób ogranicza możliwość pełnego kontrolowania odpowiednich reakcji chemicznych [7].



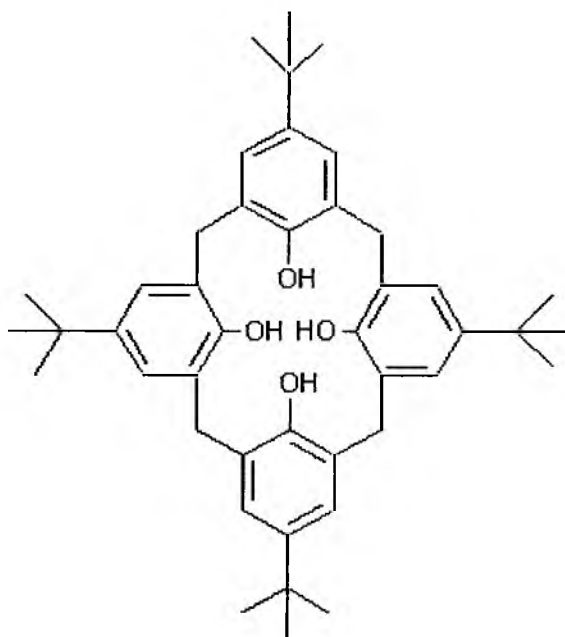
Rys.5.4.3. β -Cyklodekstryna [8]

Nazwa „kaliksareny” została wprowadzona przez Gutschego, który dostrzegł podobieństwo między ich budową przestrzenną a kształtem greckiej wazy (ang. calixarenes, calix z gr. kielich i arene od obecności pierścienia aromatycznego).

Kaliksareny reprezentują kolejną grupę związków mogących występować w charakterze związków „gospodarzy”. Dzieje się tak dlatego, że związki te są zaliczane do

receptorów makrocyclicznych i można je łatwo otrzymać podczas katalizowanej kwasami i zasadami kondensacji jedno- i wielowodorotlenowych fenoli z aldehydami. Możliwość zmiany rozmiarów trójwymiarowej wnęki molekularnej sprawia, że kaliksareny znajdują zastosowanie jako cząsteczki „gospodarzy” dla wielu indywiduów chemicznych, m.in. dla metali przejściowych.

W odróżnieniu np. od eterów koronowych kaliksareny tworzą związki kompleksowe oparte na oddziaływaniach różnego typu; mogą to być np. wiązania wodorowe, koordynacyjne, czy też van der Waalsa. [7].



Rys.5.4.4. Kaliks[4]aren z podstawnikami para tert-butyłowymi [9]

Opisane powyżej trzy klasy związków niskocząsteczkowych w określonych warunkach tworzą żele. Dzieje się tak dlatego, że związki te mogą łączyć się ze sobą w wielu punktach, tworząc strukturę trochę podobną do gąbki. Dodatkowo przestrzeń pomiędzy nimi wypełnia rozpuszczalnik, dzięki czemu tworzy się układ o konsystencji galaretowatej.

5.5. Literatura

1. Chemia supramolekularna, praca zbiorowa pod red. J. J. Ziółkowskiego, Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław, 1997
2. F. Schoonbeek, Making it all stick together. The gelation of organic liquids by small organic molecules (praca doktorska), Rijksuniversiteit Groningen, Groningen 2001
3. D. Jordon Lloyd, Colloid Chem., **1**, 767 (1926)
4. P. Flory, J. Disc. Faraday Soc., **57**, 5 (1974)
5. W. M. Gelbart, A. Ben-Shaul, J. Phys. Chem., **100**, 13169 (1996)
6. P. Terech, R. G. Weiss, Chem. Rev., **97**, 3133 (1997)
7. F. Vögtle, E. Weber, Host guest complex. Macrocycles, synthesis, structures, applications, Springer-Verlag, Berlin, 1985
8. www.mlyniec.gda.pl
9. www.en.wikipedia.org

6. Zastosowanie technik chromatograficznych do rozdzielania enancjomerów

Prawie połowa obecnie używanych leków jest chiralna. Jak wiadomo, aktywność farmakologiczna chiralnych leków jest często ograniczona tylko do jednego z enancjomerów [1]. Pomimo to tylko około 25% leków chiralnych jest podawanych w postaci pojedynczego enancjomeru. Jak to już zostało powiedziane we wcześniejszych rozdziałach, między enancjomerami mogą wystąpić jakościowe i ilościowe różnice w aktywności. Zdarzyć się może tak, że farmakologicznie nieaktywny enancjomer może przejawiać niepożądany efekt, a w szczególnych przypadkach nawet ujawnić swoje właściwości toksyczne. Enancjomery mogą się różnić wchłanianiem, efektywnością przyswajania przez organizm, zdolnością do wiązania się z białkami czy powinowactwem do receptorów [2]. Ponadto mogą różnić się także szybkością metabolizmu. Opracowanie nowych leków wymaga m.in. wsparcia analitycznego w postaci sprawnie działających metod kontroli czystości enancjomerów. Rozdziały enancjomerów na skalę analityczną prowadzone są od prawie trzech dekad przy wykorzystaniu technik chromatograficznych takich, jak chromatografia gazowa (ang. gas chromatography), wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. high performance liquid chromatography) i chromatografia cienkowarstwowa (ang. thin layer chromatography). Ostatnio także elektroforeza kapilarna (ang. capillary electrophoresis) jest z dużym powodzeniem wykorzystywana do tego celu.

Idealnym sposobem otrzymywania czystych enancjomerów leków była by selektywna synteza enancjomerów. Jednak takie przedsięwzięcie z wielu względów nie zawsze jest możliwe. Zazwyczaj jest ono skomplikowane i stosunkowo drogie. Dlatego też rozdziały mieszanin racemicznych są często bardziej korzystne. Spośród wymienionych wyżej metod rozdzielania enancjomerów na szczególną uwagę zasługuje chromatografia cieczowa, która coraz częściej odgrywa istotną rolę także w skali preparatywnej [3-9]. Wszystkie opisane poniżej techniki będą uwzględniały tylko rozdziały bezpośrednie.

6.1. Chromatografia gazowa

Chromatografia gazowa może być wykorzystywana do rozdzielania enancjomerów w sposób pośredni i bezpośredni. Rozdziały bezpośrednie mogą być prowadzone przy pomocy następujących chiralnych faz stacjonarnych (ang. chiral stationary phases, CSPs):

- ✓ *Chiralne fazy stacjonarne na bazie aminokwasów i diamidów.* Pionierem w pracach nad rozdziałem związków chiralnych był Gil-Av i wsp. Opracowali

oni pierwsze chiralne fazy stacjonarne do chromatografii gazowej, oparte na zderywatygowanych aminokwasach, tj. na estrze laurylowym N-trifluoroacetylo-L-izoleucyny [10] i na estrze cykloheksylowym N-trifluoroacetylo-L-walilo-L-waliny [11]. Fazy te służyły do rozdzielania N-trifluoroacetylowych pochodnych aminokwasów. Chiralny rozdział prowadzony przy pomocy tych faz polegał na tworzeniu się licznych wiązań wodorowych.

- ✓ *Chiralne fazy stacjonarne na bazie cyklodekstryn.* Cyklodekstryny są bardzo często używane do rozdzielania chiralnych. Cyklodekstryny to cykliczne oligosacharydy, które składają się z sześciu, siedmiu, lub ośmiu jednostek D-(+)-glukopiranozowych. Cyklodekstryny posiadają hydrofilową powierzchnię zewnętrzną kształtem przypominającą ścięty stożek z hydrofobową wnęką. Głębokość tej wnęki może być dodatkowo zmieniana poprzez derywatyzację. Grupy hydroksylowe znajdujące się przy atomach węgla 2, 3 i 6 jednostki monomerycznej są podatne na derywatyzację. Rozdział chiralny polega na oddziaływaniu hydrofobowej grupy pochodzącej od analitu z hydrofobową częścią cząsteczki cyklodekstryny. Dodatkowo mogą występować oddziaływania z analitem poprzez wiązania wodorowe grup hydroksylowych położonych przy atomach węgla 2 i 3 przy wyższej krawędzi cyklodekstryny oraz oddziaływania dipol-dipol. Schurig i Novotny [15] użyli metylowanych β -cyklodekstryn rozpuszczonych w średnio polarnym polisiloksanie. Armstrong i wsp. [16] wprowadzili serię bardziej polarnych faz cyklodekstrynowych, charakteryzujących się różną selektywnością. Rozdział chiralny przy pomocy cyklodekstryn generalnie polega na tworzeniu połączeń inkluzyjnych analitu z chiralną wnęką cyklodekstryny. Jednak w większości przypadków dodatkowe oddziaływania odpowiedzialne za rozdział to: wiązania wodorowe, oddziaływania dipol-dipol, oddziaływania elektrostatyczne i oddziaływania hydrofobowe. Przy pomocy tych faz można rozdzielać olejki i substancje zapachowe oraz aromaty spożywcze.
- ✓ *Chiralne fazy stacjonarne na bazie kaliksarenów.* Kaliksareny reprezentują nową klasę związków chiralnych, które można zastosować do bezpośrednich rozdzielania chiralnych. Fazy te zostały opracowane przez Pfeiffera i Schuriga [17] poprzez przyłączenie amidu L-walino-tert-butyłowego do ośmiu grup hydroksylowych resorc[4]arenu za pomocą fragmentu

karbonylometylenowego, a następnie całość przyłączono poprzez ω -alkeny do dimetylopolisiloksanu. Fazy te znalazły zastosowanie do rozdziału zderywatyzowanych aminokwasów, alkoholi i amin. W takim przypadku rozdział chiralny częściowo opiera się na tworzeniu inkluzyjnego połączenia z wnątką cyklodekstryny i częściowo na wiązaniach wodorowych.

6.2. Wysokosprawna chromatografia cieczowa

Wysokosprawna chromatografia cieczowa może być wykorzystywana do rozdziału enancjomerów, prowadzonego w sposób pośredni i bezpośredni. Rozdziały bezpośrednie przeprowadzane są przy użyciu chiralnych faz stacjonarnych lub z zastosowaniem chiralnych faz ruchomych (ang. chiral mobile phases, CMPs). Zarówno rozdziały pośrednie, jak i bezpośrednie mają swoje wady i zalety. Rozdziały bezpośrednie prowadzone w kolumnach chromatograficznych z użyciem chiralnych faz stacjonarnych są wygodniejsze niż rozdziały pośrednie, a także mają zastosowanie do rozdziału w skali preparatywnej. Rozdziały bezpośrednie wymagają jednak użycia rozmaitych i drogich kolumn w celu rozwiązania zróżnicowanych problemów. Z drugiej strony rozdziały przy użyciu chiralnych faz ruchomych jawią się jako prosta i wygodna alternatywa, jednakże nie zawsze możliwa do zastosowania. Zastosowanie faz ruchomych zawierających czynnik chiralny jest możliwe tylko jednokrotnie, dlatego też ta technika jest nieopłacalna w przypadku drogich chiralnych modyfikatorów faz ruchomych.

Poniżej przedstawiono różne fazy stacjonarne i ruchome umożliwiające rozdział chiralny w wysokosprawnej chromatografii cieczowej:

- ✓ *Fazy stacjonarne z udziałem wielokrotnych wiązań wodorowych.* Te fazy zostały po raz pierwszy wprowadzone przez Dobashiego i Harę [18,19], którzy użyli aminokwasów jako czynnika chiralnego chemicznie związanego z żelom krzemionkowym. Autorzy zastosowali te fazy do rozdziałów chiralnych aminokwasów i zderywatyzowanych hydroksykwasów przy użyciu niewodnych faz ruchomych. Na fazie stacjonarnej zawierającej amid kwasu winowego można rozdzielać: zderywatyzowane β -aminoalkohole, diole i barbiturany [20]. Zakres zastosowania tych faz jest jednak ograniczony ze względu na niewielką siłę wiązań wodorowych.
- ✓ *Chiralne fazy stacjonarne zawierające donory i akceptory elektronów π .* Fazy te zostały zaproponowane przez Pirkle'a [21,22]. Pierwsza w tej grupie

zsyntezowana faza zawierała (R)-N-(3,5-dinitrobenzoilo)fenyloglicynę jako czynnik chiralny o właściwościach akceptora elektronów. Później została opracowana znaczna liczba chemicznie związanych faz stacjonarnych o właściwościach donorów i akceptorów elektronów π . Fazy te zawierały kilka typów aminokwasów pochodnych dinitrobenzoilu. Obszerny przegląd tych badań przedstawił w swoim artykule Welch [23]. Fazy te znalazły zastosowanie do rozdzielania chiralnego β -blokerów [24] i niesteroidowych leków przeciwzapalnych [25-27]. 2,4,6-Trichloro-1,3,5-triazyna została użyta do przyłączania różnych substancji chiralnych z zasadowymi elektronami π jako chiralnych selektorów do żelu krzemionkowego [28,29]. Omawiane fazy wykazują dużą enancjoselektywność względem zderzywanych aminokwasów zawierających grupy kwasowe z elektronami π . Chiralne fazy stacjonarne zawierające naftyloetyloaminę były przygotowywane z użyciem kwasu (R,R)-winowego [30] lub mocznikowych pochodnych aminokwasów [31]. Machida [32] otrzymał fazę stacjonarną na bazie diamidu kwasu winowego, związanego z resztą p-chlorofenyłową i zastosował ją do rozdzielania 1,2-dioli, 2,2'-dihydroksy-1,1'-binaftyłu i niektórych β -blokerów. Nowe chiralne fazy stacjonarne, w których grupa 1,2-difenyloetylo-1,2-diaminowa była zastąpiona przez 1,2-difenylo-1-aminoetanową wykazują dużą enancjoselektywność względem różnych amidów, moczników i estrów [33]. Chiralne fazy stacjonarne zawierające alkaloidy jako czynnik chiralny wykazują enancjoselektywność względem kwasów 2-aryloksypropionowych [34].

- ✓ *Fazy cyklodekstrynowe.* Cyklodekstryny są używane w wysokosprawnej chromatografii cieczowej w obu formach, tzn. mogą one służyć jako modyfikatory fazy ruchomej, jak również tworzyć chiralną fazę stacjonarną. Cyklodekstryny stosowane jako chiralne fazy stacjonarne mogą być używane w układzie normalnych i odwróconych faz. Po raz pierwszy chiralne fazy stacjonarne zawierające cyklodekstryny chemicznie związane z żel krzemionkowym zostały na szeroką skalę zastosowane przez Armstronga [35,36]. Chang badał zależność między fazą ruchomą a wielkością pierścienia cyklodekstryny przy użyciu kilku klas leków [37]. Z kolei Armstrong i Mond [38] zaobserwowali, że β -blokery ulegają lepszemu rozdzielaniu enancjomerycznemu przy użyciu organicznych faz polarnych zawierających β -

lub γ -cyklodekstryny. Kilka zderywatyzowanych cyklodekstryn wykazuje w licznych przypadkach dużą enancjoselektywność. Najpowszechniej używane zderywatyzowane cyklodekstryny mogą być metylowane, acylowane, karboksymetylowane, lub hydroksypropylowane. Stalcup i Gahm [39] wykazali, że chiralne fazy stacjonarne zawierające sulfonowane β -cyklodekstryny mogą być używane do chiralnego rozdzielania kilku klas leków. Li i Purdy [40] opracowali kilka innych faz złożonych z cyklodekstryn o zróżnicowanych możliwościach oddziaływań międzycząsteczkowych, a wśród nich m.in. cyklodekstryny zmodyfikowane przy pomocy metylobenzyloaminy i naftyloetyloaminy. Takie zmodyfikowane fazy stacjonarne wykazują dużą enancjoselektywność względem wielu analitów. Tworzenie się kompleksów inkluzyjnych i wiązań wodorowych oraz suma wszystkich wymienionych poniżej oddziaływań (tj. oddziaływań typu π - π , oddziaływań hydrofobowych i oddziaływań sterycznych) umożliwia w efekcie końcowym skuteczną enancjoseparację.

- ✓ *Chiralne fazy stacjonarne na bazie polisacharydów.* Chemicznie związane fazy polisacharydowe charakteryzują się bardzo dużą zdolnością rozdzielczą względem wielu różnych klas chiralnych związków chemicznych. Naturalna celuloza wykazuje słabą zdolność rozdzielczą [41,42]. Hesse i Hagel wykazali, że mikrokrystaliczny trioctan celulozy wytwarza struktury trzeciorzędowe i tworzy chiralne wnęki, zdolne do stereoselektywnego oddziaływania z rodnikami aromatycznymi [43,44]. Okamoto [45,46] zsyntezował trioctan celulozy w inny sposób i powlekl nim makropory żelu krzemionkowego. Zaobserwował, że enancjoselektywność takiej fazy była zupełnie inna, niż fazy przygotowanej wcześniej przez Hessego i Hagela. Różnica pomiędzy fazą przygotowaną przez Hessego i Hagela, a fazą przygotowaną przez Okamoto polegała na tym, że w przypadku tej drugiej podstawowe oddziaływania z analitami były sumą oddziaływań poprzez wiązania wodorowe i oddziaływań dipol-dipol [47,48]. Zastąpienie celulozy amylozą powoduje zmianę enancjoselektywności fazy [49]. Oprócz celulozy i amylozy także inne polisacharydy, takie jak chitosan, chityna i amylopektyna mogą być użyte w preparatyce chiralnych faz stacjonarnych.
- ✓ *Antybiotyki makrocykliczne.* Antybiotyki makrocykliczne są bardzo efektywnymi odczynnikami chiralnymi, stosowanymi zarówno w

wysokosprawnej chromatografii cieczowej, jak i w elektroforezie kapilarnej. Makrocykliczne antybiotyki posiadają kilka centrów stereogenicznych i grup funkcyjnych, zdolnych do wielopunktowych oddziaływań międzycząsteczkowych z chiralnym analitem. Do makrocyklicznych antybiotyków zaliczyć należy wankomycynę [50], która jest stosowana do chiralnego rozdziału m.in. barbituranów, cyklicznych amidów i hydantoin. Tejkoplanina [51] jest stosowana do rozdziału aminokwasów, dipeptydów i nietypowych aromatycznych alkilo- β -aminokwasów. Wankomycyna, jak i tejkoplanina są stosowane jako chiralne fazy stacjonarne. Rystoceina A może być stosowana do rozdziału wielu związków zarówno w układzie normalnych, jak i odwróconych faz [52]. Awoparcyna, która została ostatnio wprowadzona jako czynnik chiralny, uzupełniła listę wymienionych wcześniej antybiotyków makrocyklicznych, stosowanych jako chiralne fazy stacjonarne [53]. Ostatnio zostały także opracowane nowe chiralne fazy stacjonarne, zawierające makrocykliczne glikopeptydy, których zdolność rozdzielcza jest porównywalna z tejkoplaniną [54].

- ✓ *Etery koronowe.* Etery koronowe są makrocyklicznymi polieterami, zdolnymi do tworzenia kompleksów inkluzyjnych typu gospodarz-gość z jonami metali alkalicznych i z jonami metali ziem rzadkich. Cram [55] przygotował fazy stacjonarne do klasycznej chromatografii cieczowej z wykorzystaniem eterów koronowych chemicznie związanych z polistyrenem lub z żelą krzemionkowym. Fazy te znalazły zastosowanie do chiralnego rozdziału aminokwasów [56]. Podstawniki w eterze koronowym znajdujące się w płaszczyźnie pionowej względem pierścienia makrocyklicznego tworzą barierę chiralną, która dzieli przestrzeń dostępną dla podstawników przy centrum chiralnym badanego analitu. Stąd powstają dwa różne diastereoizomeryczne kompleksy inkluzyjne między danym eterem koronowym, a dwoma antypodami danego związku. Fazy do wysokosprawnej chromatografii cieczowej zawierające zderywatyzowane polimeryczne etery koronowe zaadsorbowane na żelu krzemionkowym zostały zsyntezowane przez Shinbo i znalazły zastosowanie do rozdziału aminokwasów [57], różnych amin pierwszorzędowych [58] i oraz nietypowych alkilo- β -aminokwasów [59]. Jedyny problem, jaki się pojawia podczas stosowania tego typu faz, polega na stabilności chemicznej samej fazy.

- ✓ *Syntetyczne polimery chiralne.* Blaschke [60] zaprojektował poliakryloamidy i polimetakryloamidy z chiralnymi łańcuchami bocznymi. Tak przygotowane fazy służyły do rozdzielania m.in. barbituranów, benzodiazepin i hydantoin. Okamoto [61] zsyntezował polimetakrylany, które wykazywały stereoselektywność dla szerokiego spektrum par enancjomerów. Zdolność rozdzielcza tych faz dodatkowo wzrosła, kiedy zostały one kowalencyjnie związane z żelazem krzemionkowym [62].
- ✓ *Chiralne fazy stacjonarne z wykorzystaniem białek.* Białka znalazły zastosowanie do chiralnego rozdzielania leków zarówno w chromatografii cieczowej, jak i w elektroforezie kapilarnej. Białka są zbudowane z chiralnych aminokwasów ułożonych blokowo i z glikoprotein zawierających w swojej strukturze dodatkowo cukry. Białka tworzą struktury przestrzenne i umożliwiają rozdzielanie chiralne wskutek zróżnicowanych oddziaływań hydrofobowych, elektrostatycznych i poprzez wiązania wodorowe z parami antymerów. Fazy te znalazły zastosowanie do rozdzielania zderywatyzowanych kwasów 2-arylopropionowych, benzodiazepin [63], leków o charakterze kwasów, zasad oraz obojętnych cząsteczek [64].
- ✓ *Chromatografia kompleksacyjna.* Technika ta została wprowadzona przez Davankova i Rogozhina [65] we wczesnych latach siedemdziesiątych ubiegłego stulecia i była jedną z pierwszych technik, jakie z powodzeniem zastosowano do rozdzielania chiralnych. Rozdział chiralny jest tu oparty na tworzeniu się związku kompleksowego między czynnikiem chiralnym, a analitem w charakterze ligandu. Pierwsze fazy przygotowane przez Davankova do klasycznej chromatografii kolumnowej były oparte na polimerach polistyrenowo-diwinylbenzenowych, zawierających dodatkowo kompleksy aminokwasów z jonami metali. Takie fazy służyły do rozdzielania aminokwasów. Ostatnio wprowadzono chiralne fazy stacjonarne ze związanymi z żelazem krzemionkowym amidami: S i R-feniloalaniny, a także (S,R) i (S,S)-N,N-(2-hydroksypropylo)-feniloalaniny. Te fazy stacjonarne znacznie ułatwiły rozdzielanie aminokwasów, zderywatyzowanych aminokwasów, dipeptydów i hydroksykwasów. Nowsze fazy znalazły zastosowanie także do rozdzielania barbituranów. Wachsmann i Brückner [66] zsyntezowali fazy stacjonarne wiążąc L-prolinę i L-lizynę z aminopropylsilanizowaną krzemionką. Fazy te znalazły zastosowanie do rozdzielania aminokwasów i N-(2,4-dinitrofenylo)-

aminokwasów. Alternatywą względem faz chemicznie związanych są nośniki impregnowane czynnikiem chiralnym. Davankov użył kolumny zawierającej nośnik pokryty zderywatyzowaną N-n-alkilo-L-hydroksyproliną w układzie odwróconych faz do rozdzielania aminokwasów. Wan [67] zsyntezował fazy chiralne pochodne L-proliny i L-feniloalaniny, poprzez ich alkiłowanie i aryłowanie. Fazy te zawierały łańcuchy boczne siedmio-, dziewięcio- i dwunastowęglowe, lub też grupę metylobenzylową, czy metylonaftylową. Dzięki zastosowaniu takich faz zdołał rozdzielić 36 aminokwasów. Inną alternatywną techniką było dodanie chiralnych kompleksów metali jako modyfikatora fazy ruchomej. Użycie kompleksów miedzi z dwiema cząsteczkami L-proliny zostało po raz pierwszy opisane przez Gil-Ava [67]. Tej techniki nie można było jednak zastosować do rozdzielania nie zderywatyzowanych aminokwasów, ponieważ wówczas pojawiały się problemy z detekcją.

- ✓ *Chiralna chromatografia par jonowych.* W tym przypadku mechanizm rozdzielania jest oparty na tworzeniu się diastereomerycznych par jonowych między chiralnym przeciwjonem, a enancjomerycznymi analitami. W 1981 roku Pettersson i Schill [69] jako pierwsi użyli kwasu (+)-10-kamforosulfonowego jako modyfikatora fazy ruchomej oraz diolowej fazy stacjonarnej do rozdzielania enancjomerycznych par β -blokerów. Knox i Jurand [70] opisali przeprowadzony przez siebie chiralny rozdział enancjomerów tryptofanu i glicylofeniloalaniny.
- ✓ *Rozdział na skalę preparatywną.* Użycie chiralnej chromatografii na skalę preparatywną powoduje wzrost produkcji enancjomerycznie czystych leków [71].

6.3. Chromatografia cienkowarstwowa

W porównaniu z innymi technikami chromatograficznymi, chromatografia cienkowarstwowa była używana do rozdzielania chiralnych znacznie rzadziej. Technika ta może nie jest zdolna rywalizować z wysokosprawną chromatografią ciecząową i chromatografią gazową, jeśli chodzi o sprawność i wydajność rozdzielania, jednakże mimo to posiada kilka znaczących zalet. Chromatografia cienkowarstwowa jest przede wszystkim prostą, niedrogą i szybką techniką rozdzielania o szerokim spektrum zastosowań praktycznych.

Wiele próbek można analizować na płytce równolegle, a zastosowanie odpowiednich odczynników wywołujących oraz densytometrii pozwala na selektywną detekcję. Jeśli chodzi o rozdziały chiralne, to mogą one być prowadzone z zastosowaniem chiralnych faz stacjonarnych lub chiralnych faz ruchomych. Poniżej przedstawiono kilka modyfikacji klasycznych faz stacjonarnych oraz faz ruchomych, umożliwiających prowadzenie rozdzałów chiralnych:

- ✓ *Chromatografia kompleksacyjna.* Wymiana ligandów jest najczęściej wykorzystywana do rozdzałów chiralnych właśnie w chromatografii cienkowarstwowej. Alak i Armstrong [72] oraz Günther [73] użyli jako czynnika chiralnego kompleksu miedzi (II) z chiralną pochodną L-proliny naniesionego jako impregnant na fazę stacjonarną typu RP-18. Przy pomocy tak zmodyfikowanej fazy RP-18 można rozdzielać aminokwasy, α -metyloaminokwasy, N-alkiloaminokwasy, dipeptydy, α -hydroksykwasy, halogenki kwasów karboksylowych i niektóre związki heterocykliczne.
- ✓ *Cyklodekstryny.* Armstrong [74] opisał rozdzał zderywatyzowanych, chiralnych aminokwasów, metalocenów i sulfonianów w układzie odwróconych faz, stosując β -cyklodekstrynę jako modyfikatora fazy ruchomej. Szereg chiralnych aminokwasów można rozdzielać przy pomocy α -cyklodekstryny, β -cyklodekstryny lub spolimeryzowanej cyklodekstryny, rozpuszczonych jako modyfikatory w fazie ruchomej. Nowe, zsyntezowane przez Zhu [75] chiralne fazy stacjonarne zawierają β -cyklodekstryny podstawione grupą 3,5-dinitrobenzylową. Fazy te są przeznaczone do rozdzału aminokwasów w układzie faz normalnych i odwróconych. Bieganowska [76] rozdzieliła zderywatyzowane enancjomery 2-amino-1-butanolu przy użyciu chiralnej fazy ruchomej z dodatkiem β -cyklodekstryny.
- ✓ *Polisacharydy.* Użycie naturalnej, mikrokrystalicznej celulozy jako chiralnej fazy stacjonarnej i jej zastosowanie do rozdzału enancjomerów kilku aromatycznych aminokwasów opisali Bach i Haas [77], Yuasa i wsp. [78] oraz Lederer i wsp. [79]. Lepri [80] rozdzielił 21 różnych mieszanin racemicznych przy pomocy mikrokrystalicznego trioctanu celulozy. Malinowska [81] przedstawiła możliwość użycia chityny i chitozyny jako chiralnych faz stacjonarnych pochodzenia naturalnego.
- ✓ *Antybiotyki makrocykliczne.* Armstrong i Zhou [82] wprowadzili wankomycynę jako czynnik chiralny do rozdzału enancjomerów. Bhushan i

Parshad [83] opisali wykorzystanie antybiotyków makrocyklicznych do rozdziału podstawionych aminokwasów.

- ✓ *Białka.* Lepri opisał użycie fazy ruchomej z modyfikatorem w postaci albuminy pochodzącej z krwi wołowej do rozdziału enancjomerów warfaryny, aminokwasów oraz kilku innych związków chiralnych w układzie odwróconych faz [84].
- ✓ *Polimery robione na „krawiecka miarę”* (ang. *molecularly imprinted polymers, MIPs*). Kriz [85] spreparował polimer korzystając z anilidu L-feniloalaniny jako molekularnej „foremki” i przy jego pomocy rozdzielił L- i D-feniloalaninę. Suedee [86] przygotował fazy stacjonarne z wykorzystaniem chininy, pseudoefedryny i (-)-norefedryny jako foremek i dzięki nim rozdzielił leki adrenergiczne.
- ✓ *Chromatografia par jonowych.* Li [87] przedstawił możliwość wykorzystania techniki chiralnych par jonowych z D-(+)-10-kamforosulfonianem amonu jako modyfikatorem fazy ruchomej przeznaczonej do rozdziału aromatycznych aminoalkoholi na żelu krzemionkowym jako na fazie stacjonarnej.

6.4. Elektroforeza kapilarna

Chiralne rozdziały techniką elektroforezy kapilarnej mogą być prowadzone w sposób pośredni i bezpośredni. Jak już zostało zaznaczone wcześniej, w niniejszym rozdziale skupimy się wyłącznie na rozdziałach bezpośrednich. Rozdziały bezpośrednie uzyskuje się dzięki wprowadzeniu do elektrolitu związku chiralnego. Związkami chiralnymi mogą być:

- ✓ *Cyklodekstryny.* Cyklodekstryny są najczęściej stosowanym modyfikatorem chiralnym w elektroforezie kapilarnej. Pierwsze zastosowanie cyklodekstryn do rozdziałów chiralnych zostało przedstawione przez Snopka i wsp. [88] w izotachoforezie. Cyklodekstryny znalazły zastosowanie do chiralnych rozdziałów m.in. β -blokerów, środków antypsychotropowych, antydepresantów, barbituranów, leków przeciwko astmie, epilepsji i nadciśnieniu.
- ✓ *Obojętne pochodne cyklodekstryn.* Miura [89] zsyntezował cyklodekstryny metylowane i acylowane, i zastosował je do rozdziału zderywatyzowanych aminokwasów. β -Cyklodekstryny podstawione grupą cyjanoetylową zostały ostatnio wprowadzone przez Aturkiego [90]. Zerbinati [91] podstawił β - i γ -

cyklodekstryny grupą etylowęgłanową i zastosował je do rozdziału dichlorowanych herbicydów.

- ✓ *Cyklodekstryny z podstawnikami anionowymi.* Ta grupa cyklodekstryn jest odpowiednia do rozdziału leków zasadowych i obojętnych. Najczęściej używanymi cyklodekstrynami z tej grupy są β -cyklodekstryny sulfonowane, a także podstawione grupą sulfobutyłową i sulfoetyłową. Takie cyklodekstryny jak karboksymetylo- β -cyklodekstryna i karboksyetylo- β -cyklodekstryna znalazły szerokie zastosowanie do rozdziału związków obojętnych i zasadowych. Cyklodekstryny z podstawnikiem fosforanowym to kolejna grupa cyklodekstryn z podstawnikami anionowymi, z dużym powodzeniem stosowana do rozdziału szeregu enancjomerycznych leków [92].
- ✓ *Cyklodekstryny z podstawnikiem kationowym.* Do tej grupy zaliczamy m.in. następujące cyklodekstryny: 6-[(2-aminoetylo)amino]-6-deoksy- β -cyklodekstrynę, 6^A-metyloamino- β -cyklodekstrynę, 6^A,6^D-dimetyloamino- β -cyklodekstrynę, siedmio podstawioną metyloamino- β -cyklodekstrynę i mono (6-amino-6-deoksy)- β -cyklodekstrynę, które jako pierwsze spośród dodatnio naładowanych cyklodekstryn zostały zastosowane do chiralnych rozdziałów szeregu związków kwasowych i obojętnych. Haynes [93] zastosował nowy siedmio podstawiony optycznie czynny izomer dodatnio naładowanej β -cyklodekstryny (heptakis (6-metoksyetyloamino-6-deoksy)- β -cyklodekstryna) i sprawdził jego zdolność rozdzielczą na niesteroidowych lekach przeciwzapalnych.
- ✓ *Cyklodekstryny amfoteryczne.* Jedna z nowych amfoterycznych pochodnych cyklodekstryn, mono-(6-glutaminyloamino-6-deoksy)- β -cyklodekstryna, o niezdefiniowanej strukturze, znalazła zastosowanie do rozdziału związków obojętnych, kwasowych i zasadowych [94].
- ✓ *Cyklodekstryny plus modyfikatory achiralne.* Cyklodekstryny z dodatkiem boranów znalazły zastosowanie do rozdziału chiralnych dioli. Chiralny rozdział oparty jest w tym przypadku na tworzeniu związków kompleksowych między tak zmodyfikowanymi boranem cyklodekstrynami a diolami [95].
- ✓ *Obojętne mono-, oligo- i polisacharydy.* Maltodekstryny i dekstryny zostały z powodzeniem zastosowane do rozdziału związków, głównie kwasowych. Chankvetadze [96] wykazał, że rozpuszczalne w wodzie naturalne polisacharydy, takie jak amyloza, mogą być z powodzeniem użyte do

rozdziałów chiralnych. Nakamura [97] udowodnił, że nawet monosacharydy takie, jak D-glukoza i D-mannoza mogą umożliwiać rozdziały chiralne. Mechanizm przy pomocy którego dochodzi w tym przypadku do rozdziałów chiralnych, nie jest jeszcze do końca poznany. O dekstrynach wiadomo tyle, że tworzą helisy o charakterze hydrofobowym. W przypadku pozostałych cukrów uważa się, że mogą one oddziaływać poprzez wiązania wodorowe i dipolowe własnych grup hydroksylowych z rozdzielanymi enancjomerami.

- ✓ *Polisacharydy obdarzone ładunkiem.* Polisacharydy obdarzone ładunkiem ujemnym takie, jak heparyna, siarczan chondroityny C, siarczan chondroityny A i siarczan dekstranu, zostały użyte do rozdziałów związków o charakterze zasadowym. Polisacharydy obdarzone ładunkiem dodatnim wprowadzone przez Nishiego [98] (takie, jak siarczany kanamycyny i fradiomycyny), znalazły zastosowanie do rozdziału par enancjomerów o charakterze kwaśnym.
- ✓ *Chiralne etery koronowe.* Jedynym chiralnym eterem koronowym, który dotychczas znalazł zastosowanie w elektroforezie kapilarnej, jest kwas tetrakarboksylowy pochodny 18-korony-6, wprowadzony przez Kuhna [99]. Eter ten znalazł zastosowanie do rozdziału chiralnego m.in. dipeptydów, aminokwasów i różnych leków zawierających grupę aminową.
- ✓ *Kaliksareny.* Kaliksareny są związkami makrocyklicznymi, zawierającymi w swojej strukturze pierścień benzenowy połączony z grupami metylowymi, tworzącymi wnękę hydrofobową, która jest zdolna do tworzenia kompleksów inkluzyjnych. Peña zsyntezowała następujące rozpuszczalne w wodzie kaliksareny: (N-acylo-L-alanino)kaliks[4]aren i (N-acylo-L-walino)kaliks[4]aren [100]. Przy pomocy tych związków udało się je rozdzielić m.in. następujące pary enancjomerów: 2-hydroksy-1,1'-binaftol i 2,2'-diamino-1,1'-binaftol.
- ✓ *Antybiotyki makrocykliczne.* Związki te zostały po raz pierwszy wprowadzone do rozdziałów chiralnych techniką elektroforezy kapilarnej przez Armstronga [101]. Antybiotyki makrocykliczne posiadają kilka centrów asymetrii i wiele grup funkcyjnych, zdolnych do wielopunktowych oddziaływań z rozdzielanymi analitami. Antybiotyki, które znalazły zastosowanie przy rozdzielaniu enancjomerów należą do trzech następujących klas: ansamycyn (są to takie związki, jak ryfamycyna B i ryfamycyna SV); glikopeptydów wprowadzonych przez Armstronga (takie związki, jak ristocetyna i

tejkoplanina), i aminoglukozydów badanych przez Nishiego (takie związki, jak streptomycyna, fradiomycyna i kanamycyna) [98]. Antybiotyki te znalazły zastosowanie do rozdziału enancjomerów o charakterze kwasowym i zasadowym.

- ✓ *Białka.* W zależności od pH środowiska białka mogą być naładowane dodatnio lub ujemnie. Dzięki temu można ich używać do rozdziału związków o charakterze kwasowym i zasadowym [102].
- ✓ *Kompleksacyjna elektroforeza kapilarna.* Po udanym wykorzystaniu mechanizmu kompleksacyjnego w wysokosprawnej chromatografii cieczowej, mechanizm ten zaadaptowano również do elektroforezy kapilarnej. Dokonał tego Zare przy użyciu L-histydyny [103]. Pierwszego bezpośredniego rozdziału niezderywatyzowanych aminokwasów dokonali Schmid i Gübitz [104] przy użyciu związków kompleksowych miedzi (II) z L-proliną. Ponadto można w ten sposób rozdzielać aromatyczne aminokwasy, dipeptydy, hydroksykwasy i β -blokery.
- ✓ *Chiralne substancje powierzchniowo czynne.* Substancje powierzchniowo czynne są molekułami amfifilowymi, złożonymi z grupy polarnej („głowy”) i niepolarnego „ogona”. Powyżej stężenia krytycznego tych związków w wodzie tworzą się micle. Rozdział chiralny oparty jest na zdolności do podziału enancjomeru między chiralną fazę miceli, a elektrolit. Ding i Fritz [105] zsyntezowali substancje powierzchniowo czynne na bazie wybranych aminokwasów (L-leucyny, L-waliny, L-izoleucyny, L-seryny) i alkilochloroformów z łańcuchami o długości od 4 do 11 atomów węgla i sprawdzili ich zdolność rozdzielczą na parach antymerów propranololu, atenololu, ketaminy, laudanozyny i nefopamu. Polimeryczne aminokwasy i dipeptydy stosowane jako substancje powierzchniowo czynne zostały wprowadzone przez Warnera [106].
- ✓ *Elektroforeza kapilarna w rozpuszczalnikach niewodnych.* Rozpuszczalniki niewodne mają kilka zalet, m.in. charakteryzują się możliwością redukcji niepożądanych oddziaływań ze ściankami kapilary. Zastosowanie rozpuszczalników niewodnych podwyższa selektywność rozdziału. Różny sposób ustalania się równowagi chemicznej w układzie wodnym i niewodnym prowadzi do innej selektywności danego układu. Słabe oddziaływania międzycząsteczkowe, które są niszczone przez wodę, mogą stać się pomocne

przy rozdzielach prowadzonych w układach niewodnych. Dzięki zastosowaniu stosunkowo wyższych napięć uzyskuje się krótszy czas analizy. Po raz pierwszy rozpuszczalniki niewodne zostały zastosowane do rozdzielów chiralnych przez Valkò [107] oraz Wanga i Khalediego [108].

- ✓ *Izotachoforeza i ogniskowanie izoelektryczne.* Izotachoforeza była pierwszą elektroforetyczną techniką rozdzielu przeznaczoną do rozdzielu związków chiralnych [88]. Przy pomocy tej techniki można rozdzielać m.in. dansylowaną fenyloalaninę.
- ✓ *Nowe techniki.* Zhao i Jorgenson [109] wprowadzili cykliczną elektroforezę kapilarną i podali przykłady jej zastosowania. Liu i Fang [110] opisali możliwość połączenia techniki analizy przepływowej (ang. flow injection, FI) z elektroforezą kapilarną i zademonstrowali zdolność tej techniki do rozdzielu enancjomerów.

Na podstawie powyższego, krótkiego przeglądu literaturowego można stwierdzić, że istnieje szerokie spektrum technik i procedur chromatograficznych, które można skutecznie stosować do rozdzielu wybranych par enancjomerów. Rozdziály par enancjomerycznych są jednym z najtrudniejszych zadań, jakie stawia przed sobą współczesna chemia analityczna oraz preparatyka organiczna. Istnieje znaczna ilość par enancjomerów, których dotychczas nie udało się rozdzielić, lub rozdział których jest niepełny. Oznacza to, że rozdziály związków chiralnych to ciągle aktualny i bardzo ważny problem rozdzielczy.

Wśród czterech wybranych technik chromatograficznych, chromatografia cienkowarstwowa znajduje stosunkowo najmniej zastosowań. Nie oznacza to jednak, że technika ta jest mało użyteczna. Chromatografia cienkowarstwowa jawi się jako technika, która ma jeszcze bardzo wiele do zaoferowania. Zastosowanie densytometrii, a co za tym idzie selektywna detekcja i stosunkowo krótki czas analizy, to tylko niektóre, wybrane atuty tej techniki.

6.5. Literatura

1. G. Gübitz, M. G. Schmid, *Biopharm. Drug Dispos.*, **22**, 291 (2001)
2. M. Eichelbaum, A. S. Gross, *Adv. Drug Res.*, **28**, 1 (1996)
3. G. Gübitz, *Chromatographia*, **30**, 555 (1990)
4. J. Bojarski, *Chem. Anal.*, **42**, 139 (1997)
5. F. Gasparri, D. Misiti, C. Villani, *J. Chromatogr. A*, **906**, 35 (2001)
6. G. Subramanian, *A practical approach to chiral separations by liquid chromatography*, Wiley-VCH, Weinheim 1994
7. S. Ahuja, *Chiral separations – applications and technology*, American Chemical Society, Washington 1997
8. V. Schurig, *J. Chromatogr. A*, **906**, 275 (2001)
9. H. Y. Aboul-Enein, M. I. El-Awady, C. M. Heard, P. J. Nicholls, *Biomed. Chromatogr.*, **13**, 531 (1999)
10. N. Ôi, H. Kitahara, R. Kira, *J. Chromatogr.*, **592**, 291 (1992)
11. E. Gil-Av, B. Feibush, *Tetrahedron Lett.*, **9**, 3345 (1967)
12. V. Schurig, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **16**, 110 (1977)
13. V. Schurig, W. Burkle, K. Hintzer, R. Weber, *J. Chromatogr.*, **475**, 23 (1989)
14. M. Jung, D. Schmalzing, V. Schurig, *J. Chromatogr.*, **552**, 43 (1991)
15. V. Schurig, H.-P. Novotny, *J. Chromatogr.*, **441**, 155 (1988)
16. D. W. Armstrong, W. Y. Li, J. Pitha, *Anal. Chem.*, **62**, 214 (1990)
17. J. Pfeiffer, V. Schurig, *J. Chromatogr. A*, **840**, 145 (1999)
18. A. Dobashi, Y. Dobashi, S. Hara, *J. Liq. Chromatogr.*, **9**, 243 (1986)
19. Y. Dobashi, S. Hara, *Tetrahedron Lett.*, **26**, 4217 (1985)
20. Y. Dobashi, S. Hara, *J. Org. Chem.*, **52**, 2490 (1987)
21. W. H. Pirkle, D. W. House, J. M. Finn, *J. Chromatogr.*, **192**, 143 (1980)
22. W. H. Pirkle, J. M. Finn, J. L. Schreiner, B. C. J. Hamper, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 3964 (1981)
23. C. J. Welch, *J. Chromatogr. A*, **666**, 3 (1994)
24. W. H. Pirkle, J. A. Burke, *J. Chromatogr.*, **557**, 173 (1991)
25. W. H. Pirkle, Y. L. Liu, *Org. Chem.*, **59**, 6911 (1994)
26. W. H. Pirkle, C. J. Welch, *J. Liq. Chromatogr.*, **15**, 1947 (1992)
27. W. H. Pirkle, Y. L. Liu, *J. Chromatogr. A*, **736**, 31 (1996)
28. C.-E. Lin, C.-H. Lin, *J. Chromatogr. A*, **676**, 303 (1994)

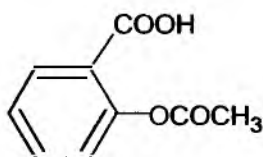
29. C.-E. Lin, F.-K. Li, C.-H. Lin, *J. Chromatogr. A*, **722**, 211 (1996)
30. N. Ôi, H. Kitahara, F. Aoki, *J. Chromatogr. A*, **666**, 457 (1994)
31. N. Ôi, H. Kitahara, F. Aoki, *J. Chromatogr. A*, **694**, 129 (1995)
32. Y. Machida, H. Nishi, K. Nakamura, H. Nakai, T. Sato, *J. Chromatogr. A*, **757**, 73 (1997)
33. G. Uray, N. M. Maier, K. S. Niederreiter, M. M. Spitaler, *J. Chromatogr. A*, **799**, 67 (1998)
34. M. Dondi, M. Flieger, J. Olsovska, C. M. Polcaro, M. Sinibaldi, *J. Chromatogr. A*, **857**, 133 (1999)
35. D. W. Armstrong, W. DeMond, *J. Chromatogr. Sci.*, **22**, 411 (1984)
36. S. M. Han, Y. I. Han, D. W. Armstrong, *J. Chromatogr.*, **411**, 376 (1988)
37. S. C. Chang, G. L. Reid, S. Chen, C. D. Chang, D. W. Armstrong, *Trends Anal. Chem.*, **12**, 144 (1993)
38. D. W. Armstrong, S. Chen, C. Chang, S. Chang, *J. Liq. Chromatogr.*, **15**, 545 (1992)
39. A. M. Stalcup, K. H. Gahm, *Anal. Chem.*, **68**, 1369 (1996)
40. S. Li, W. Purdy, *J. Chromatogr.*, **625**, 109 (1992)
41. G. Gübitz, W. Jellenz, D. Schönleber, *J. High Resol. Chromatogr.*, **3**, 31 (1980)
42. T. Fukuhara, M. Isoyama, A. Shimada, M. Itoh, S. Yuasa, *J. Chromatogr.*, **387**, 562 (1987)
43. G. Hesse, R.A. Hagel, *Chromatographia*, **6**, 277 (1973)
44. E. Francotte, *J. Chromatogr. A*, **666**, 565 (1994)
45. Y. Okamoto, K. Hatada, M. Kawashima, K. Yamamoto, *Chem. Lett.*, **5**, 739 (1984)
46. A. Ichida, T. Shibata, I. Okamoto, Y. Yuki, H. Namikoshi, Y. Toga, *Chromatographia*, **19**, 280 (1984)
47. I. Wainer, M. C. Alembik, *J. Chromatogr.*, **358**, 85 (1986)
48. E. Francotte, R. M. Wolf, *J. Chromatogr. A*, **595**, 63 (1992)
49. Y. Okamoto, R. Aburatani, K. Hatano, K. Hamada, *J. Liq. Chromatogr.*, **11**, 2147 (1988)
50. H. Y. Aboul-Enein, V. Serginese, *Chirality*, **10**, 358 (1998)
51. D. W. Armstrong, Y. Liu, K. H. Ekborg-Ott, *Chirality*, **7**, 474 (1995)
52. K. H. Ekborg-Ott, Y. Liu, D. W. Armstrong, *Chirality*, **10**, 434 (1998)
53. K. H. Ekborg-Ott, G. A. Zientara, J. M. Schneiderheinze, K. Gahm, D. W. Armstrong, *Electrophoresis*, **20**, 2438 (1999)
54. A. Berthod, T. Yu, J. P. Kullman, *J. Chromatogr. A*, **897**, 113 (2000)

55. L. R. Sousa, G. D. Y. Sogah, D. H. Hoffman, D. J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 4569 (1978)
56. G. D. Y. Sogah, D. J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 3035 (1979)
57. T. Shinbo, T. Yamaguchi, M. Sugiura, K. Nishimura, *J. Chromatogr.*, **405**, 145 (1987)
58. W. Lee, C. Y. Hong, *J. Chromatogr. A*, **879**, 113 (2000)
59. A. Péter, F. Fülöp, D. Tourwé, *J. Chromatogr. A*, **715**, 219 (1995)
60. G. Blaschke, *J. Liq. Chromatogr.*, **9**, 341 (1986)
61. Y. Okamoto, K. Hatada, *J. Liq. Chromatogr.*, **9**, 369 (1986)
62. Y. Okamoto, S. Honda, I. Okamoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 6971 (1981)
63. J. Haginaka, N. Kanasugi, *J. Chromatogr. A*, **769**, 215 (1997)
64. T. Miwa, T. Hattori, M. Ichikawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 682 (1987)
65. V. A. Davankov, S. V. Rogozhin, *J. Chromatogr.*, **60**, 280 (1971)
66. M. Wachsmann, H. Brückner, *Chromatographia*, **47**, 637 (1998)
67. Q.-H. Wan, P. N. Shaw, M. C. Davies, D. A. Barrett, *J. Chromatogr. A*, **786**, 2449 (1997)
68. E. Gil-Av, A. Tishbee, P. E. Hare, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 5115 (1980)
69. C. Pettersson, G. Schill, *J. Chromatogr.*, **204**, 179 (1981)
70. J. H. Knox, J. Jurand, *J. Chromatogr.*, **234**, 222 (1982)
71. G. Terfloth, *LC GC Eur.*, **12**, 698 (1999)
72. A. Alak, D. W. Armstrong, *Anal. Chem.*, **58**, 582 (1986)
73. K. Günter, *GIT Suppl.*, **3**, 6 (1986)
74. D. W. Armstrong, J. R. Faulkner, S. M. Han, *J. Chromatogr.*, **452**, 323 (1988)
75. Q. H. Zhu, B. Xiong, Q. Y. Deng, L. M. Zeng, *Fenxi Ceshi Xuebao.*, **19**, 8 (2000)
76. M. L. Bieganska, A. Petruczynik, *Chem. Anal.*, **43**, 583 (1998)
77. K. Bach, H. J. Haas, *J. Chromatogr.*, **136**, 186 (1977)
78. S. Yuasa, A. Shimada, K. Kameyama, M. Yasul, K. Adzuma, *J. Chromatogr. Sci.*, **18**, 311 (1980)
79. M. Lederer, K. H. N. Huu, *J. Chromatogr. A*, **723**, 405 (1996)
80. L. Lepri, V. Coas, P. G. Desideri, A. Zocchi, *J. Planar Chromatogr.*, **7**, 103 (1994)
81. I. Malinowska, J. K. Różyło, *J. Planar Chromatogr. Mod. TLC*, **4**, 138 (1991)
82. D. W. Armstrong, Y. W. Zhou, *J. Liq. Chromatogr.*, **17**, 1695 (1994)
83. R. Bhushan, V. Parshad, *J. Chromatogr. A*, **736**, 235 (1996)
84. L. Lepri, V. Coas, P. G. Desideri, D. Santianni, *Chromatographia*, **36**, 297 (1993)
85. D. Kriz, C. B. Kriz, L. I. Andersson, K. Mosbach, *Anal. Chem.*, **66**, 2636 (1994)

86. R. Suedee, C. Songkram, A. Petmoreekul, S. Sangkunakup, J. Planar Chromatogr. Mod. TLC, **11**, 272 (1998)
87. G. Li, M. Huang, G. Yang, G. Wu, A. Du, Y. Su, Sepu., **17**, 215 (1999)
88. J. Snopek, I. Jelinek, E. Smolkova-Keulemansova, J. Chromatogr., **438**, 211 (1988)
89. M. Miura, K. Kawamoto, K. Funazo, M. Tanaka, Anal. Chim. Acta, **373**, 47 (1998)
90. Z. Aturki, C. Desiderio, L. Mannica, S. Fanami, J. Chromatogr. A, **817**, 91 (1998)
91. O. Zerbinati, F. Trotta, C. Giovannoli, C. Baggiani, G. Giraudi, A. Vanni, J. Chromatogr. A, **810**, 193 (1998)
92. K. Ishibuchi, S. Izumoto, H. Nishi, T. Sato, Electrophoresis, **18**, 1007 (1997)
93. J. L. III Haynes, S. A. Shamsi, F. O'Keeffe, R. Darcey, I. M. Warner, J. Chromatogr. A, **803**, 261 (1998)
94. C. Roussel, A. Favrou, J. Chromatogr. A, **704**, 67 (1995)
95. Y. Tanaka, S. Terabe, J. Chromatogr. A, **781**, 151 (1997)
96. B. Chankvetadze, M. Saito, E. Yashima, Y. Okamoto, J. Chromatogr. A, **773**, 331 (1997)
97. H. Nakamura, A. Sano, H. Sumii, Anal. Sci., **14**, 375 (1998)
98. N. Nishi, K. Nakamura, H. Nakai, T. Sato, Chromatographia, **43**, 426 (1996)
99. R. Kuhn, F. Erni, T. Bereuter, J. Häusler, Anal. Chem., **64**, 2815 (1992)
100. M. S. Peña, Y. L. Zhang, I. M. Warner, Anal. Chem., **69**, 3239 (1997)
101. D. W. Armstrong, K. L. Rundlett, J. R. Chen, Chirality, **6**, 496 (1994)
102. D. K. Lloyd, A. F. Aubry, E. Delorenzi, J. Chromatogr. A, **792**, 349 (1997)
103. E. Gassmann, J. E. Kuo, R. N. Zare, Science, **230**, 813 (1985)
104. M. G. Schmid, G. Gübitz, Enantiomer, **1**, 23 (1996)
105. W. Ding, J. S. Fritz, J. Chromatogr. A, **831**, 311 (1999)
106. F. Haddadian, E. J. Billiot, S. A. Shamsi, I. M. Warner, J. Chromatogr. A, **858**, 219 (1999)
107. I. E. Valkó, H. Sirén, M.-L. Riekkola, J. Chromatogr. A, **43**, 242 (1996)
108. F. Wang, M. G. Khaledi, Anal. Chem., **731**, 187 (1999)
109. J. Zhao, J. W. Jorgenson, J. Microcol. Sep., **11**, 439 (1999)
110. Z. S. Liu, Z. L. Fang, Anal. Chim. Acta, **353**, 199 (1997)

7. Kwasy 2-arylopropionowe, ich izomeria optyczna oraz zastosowanie lecznicze

Kwasy 2-arylopropionowe należą do grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych. Niesteroidowe leki przeciwzapalne to szeroka, niejednorodna grupa leków o działaniu przeciwzapalnym, przeciwbólowym i przeciwgorączkowym [1]. Około trzy i pół tysiąca lat temu w starożytnym Egipcie po raz pierwszy zastosowano salicylany zawarte w liściach krzewu mirtowego do zmniejszania reumatycznego bólu pleców. Tysiąc lat później Hipokrates zastosował sok z topoli do łagodzenia bólu oczu, a korę z wierzby wykorzystał do uśmierzania bólu porodowego i grypy. Sok z topoli i kora z wierzby również zawierały salicylany. Pierwsze kliniczne zastosowanie kory z wierzby dokonało się w Anglii w 1763 roku. Jego autorem był wiejski pastor Edward Stone [2]. Życzeniem pastora było, aby ludzie na całym świecie czerpali korzyści wynikające z zastosowania salicylanów zawartych w korze wierzby. Niecałe sto lat później jego życzenie się spełniło. W 1859 roku w Niemczech po raz pierwszy zsyntezowano kwas salicylowy. Ojciec Feliksa Hoffmanna, młodego chemika pracującego dla firmy Bayer, namówił go do zrobienia bardziej „przyjaznego” salicylanu, który pomógłby mu w wyleczeniu ostrego reumatyzmu. Feliks wyprodukował kwas acetylosalicylowy, inaczej aspirynę (rys.7.0.1) i poprosił swojego ojca o wypróbowanie nowego leku. Ówczesny dyrektor firmy Bayer, doktor Heinrich Dreser, zorientował się, że ma do czynienia z nowym lekiem i postanowił go wprowadzić na rynek w 1899 roku. W tym samym czasie opublikował artykuł, w którym ogłosił, że stosowanie aspiryny jest dogodnym sposobem dostarczania organizmowi aktywnej substancji, jaką jest salicylan. W tym miejscu należy podkreślić, że pogląd głoszony przez dr Dresera jest ciągle przedmiotem wielu dyskusji, ale na podstawie zgromadzonych dowodów można stwierdzić, że aspiryna działa zgodnie ze swoim przeznaczeniem [3].



Rys.7.0.1. Wzór strukturalny aspiryny (kwasu acetylosalicylowego)

Na początku XX wieku odkryto dodatkowe właściwości aspiryny. Okazało się, że ma ona właściwości przeciwbólowe, uspokajające i przeciwgorączkowe. Później opracowano i

wprowadzono inne leki, które miały podobne właściwości jak aspiryna, stąd też zaliczono je do wspólnej grupy. Ze względu na odmienną strukturę od leków przeciwzapalnych z grupy tzw. kortykosteroidów, nazwano je niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi (ang. nonsteroidal anti-inflammatory drugs) [4]. Leki te łagodzą obrzęk, zaczerwienienie, zmniejszają stany zapalne, na ogół obniżają gorączkę i przeciwdziałają bólowi głowy. Ponadto w mniejszym lub większym stopniu eliminują stany zapalne. W zależności od przyjmowanej dawki leki te mogą powodować jako niepożądany skutek uboczny rozstrój żołądka. W przypadku większych dawek mogą też spowodować opóźnienie porodu. Przedawkowanie grozi uszkodzeniem nerek. Szczególnie interesujący jest skutek uboczny przyjmowania leków z tej grupy, polegający na zmniejszeniu krzepliwości krwi.

Jeśli chemicznie zróżnicowana grupa leków wywołuje nie tylko ten sam efekt terapeutyczny, ale także takie same skutki uboczne, to wtedy z całą pewnością można powiedzieć, że za efekt ten jest odpowiedzialny pojedynczy czynnik biochemiczny. Przez wiele lat farmakolodzy i biochemicy poszukiwali takiego właśnie wspólnego czynnika, jednak bez ogólnie akceptowanego, naukowego wyjaśnienia [5]. Dopiero w roku 1974 John Vane odkrył, że aspiryna hamuje syntezę cyklooksygenazy prostaglandynowej, w skrócie COX. Aspiryna hamuje w sposób specyficzny i nieodwracalny aktywność cyklooksygenazy poprzez acylację grupy hydroksylowej reszty serynowej tego enzymu, a przez to blokuje pierwszy etap w syntezie prostaglandyn i dlatego jest silnym czynnikiem przeciwzapalnym. Prostaglandyny mają duży wpływ na prawidłowe funkcjonowanie wielu organów, zatem zaburzenia ich produkcji objawiają się zaburzeniami pewnych czynności organizmu. Jak już zostało powiedziane wcześniej, niesteroidowe leki przeciwzapalne zapobiegają nadmiernemu krzepnięciu krwi. Oprócz blokowania pierwszego etapu w syntezie prostaglandyn, aspiryna blokuje także pierwszy etap w powstawaniu tromboksanu A_2 (TXA_2). TXA_2 jest głównym czynnikiem odpowiedzialnym za agregację płytek krwi, dzięki czemu aspiryna jest lekiem stosowanym podczas ataków i zawałów serca [6].

Cyklooksygenaza jest enzymem będącym jedną z głównych składowych, zapoczątkowujących cykl reakcji prowadzących do wytworzenia stanu zapalnego. Występuje ona w postaci co najmniej dwóch izoform: COX-1 i COX-2 [5]. Izoforma COX-1 jest odpowiedzialna za utrzymywanie normalnych funkcji żołądkowo-jelitowych, uczestniczy w regulacji przepływu krwi przez nerki i w prawidłowym funkcjonowaniu płytek krwi. Z kolei izoforma COX-2 jest pośrednikiem w przekazywaniu sygnałów o stanie zapalnym. Między innymi dzięki enzymowi COX-2 jesteśmy w stanie odczuwać ból. Na podstawie przeprowadzonych badań można powiedzieć, że aktywność niesteroidowych leków

przeciwzapalnych polega na hamowaniu działania cyklooksygenazy COX-2, podczas gdy niepożądany efekt uboczny jest efektem hamowania działania cyklooksygenazy COX-1. Ogromna większość niesteroidowych leków przeciwzapalnych obecnie dostępnych na rynku nie działa selektywnie na cyklooksygenazę COX-2 i to może być przyczyną niekorzystnych reakcji, powszechnie obserwowanych podczas leczenia. Blokowanie enzymu COX-2 powoduje złagodzenie stanu zapalnego i dolegliwości bólowych. Jak już zostało powiedziane wcześniej, enzym COX-1 działa ochronnie na błonę śluzową przewodu pokarmowego, stąd też zablokowanie go prowadzi do pojawienia się dolegliwości ze strony tego przewodu. Czasami może to prowadzić do wystąpienia bólów brzucha, zgagi, pojawienia się stanów zapalnych błony śluzowej żołądka i dwunastnicy, a w skrajnych przypadkach do powstania wrzodów, niejednokrotnie z groźnymi dla życia powikłaniami [7,8].

Przez ostatnich kilka lat liczba nowych niesteroidowych leków przeciwzapalnych produkowanych przez przemysł farmaceutyczny uległa zmniejszeniu, ale wciąż na całym świecie utrzymuje się znaczna liczba dostępnych leków z tej grupy. Do powszechnie dostępnych niesteroidowych leków przeciwzapalnych zaliczamy: aspirynę, difunisal, diklofenak, etodolak, indometacynę, sulindak, tolmetin, fenbufen, fenoprofen, flurbiprofen, ibuprofen, ketoprofen, naproksen, piroprofen, izoksykam, piroksykam, tenoksykam, meloksykam i nabumeton. Istnieje kilka czynników farmakologicznych, które mogą wpływać na zróżnicowane zachowanie się tych leków. Są to między innymi: dawka leku, okres jego połowicznego rozpadu, zdolność do wiązania się z białkami, metabolizm leku czy zmiany farmakodynamiczne, jednak indywidualna reakcja pacjenta na dany lek jest prawdopodobnie nie mniej ważna.

Większość spośród wymienionych wyżej niesteroidowych leków przeciwzapalnych jest dostępna bez recepty i dlatego należy sięgać po nie z niezwykłą rozważą. Leki te tylko wtedy spełniają swoje funkcje terapeutyczne, gdy są stosowane we właściwy sposób, z przestrzeganiem wskazań i zachowaniem środków ostrożności [9].

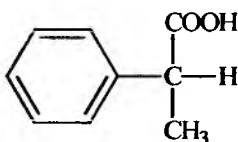
Niektóre niesteroidowe leki przeciwzapalne mogą występować w postaci dwóch optycznie czynnych enancjomerów [10]. Dzieje się tak dlatego, że leki te w swojej strukturze posiadają asymetryczny atom węgla, który jest odpowiedzialny za istnienie izomerów optycznie czynnych. Przykładowo pochodne kwasu propionowego, takie jak: ibuprofen, ketoprofen czy flurbiprofen dostępne są w postaci mieszaniny obu enancjomerów. Uważa się, że, w mieszaninie takiej, izomer R jest nieaktywny terapeutycznie, natomiast izomer S jest aktywny. Z drugiej strony pochodna kwasu propionowego, którą jest naproksen, sprzedawana jest w postaci pojedynczego, aktywnego terapeutycznie izomeru S. Zmiana struktury

przestrzennej niesteroidowych leków przeciwzapalnych z grupy pochodnych kwasu propionowego z nieaktywnego izomeru R do formy aktywnej S zdarza się czasami w żywym organizmie w zmiennym stopniu, a zatem takie zachowanie dostarcza podstawy do różnorodnej reakcji organizmu [11].

Główny problem pojawiający się podczas stosowania niesteroidowych leków przeciwzapalnych polega na występowaniu niekorzystnych efektów ubocznych. Jest rzeczą oczywistą, że pojawiające się efekty uboczne są w dużej mierze zależne od wieku pacjenta. Stosowanie tych leków u ludzi starszych może stanowić znaczne ryzyko. Ostatnio prowadzone badania sugerują istnienie pewniej hierarchii wśród niesteroidowych leków przeciwzapalnych. Hierarchia ta dotyczy „zdolności” wywoływania w różnych warunkach wrzodów żołądka [12]. Niesteroidowe leki przeciwzapalne mogą się dzielić na takie, które charakteryzują się niską możliwością wywołania wrzodów żołądka (np. ibuprofen i diklofenak), średnią (np. naproksen) i wysoką (np. ketoprofen) [13]. Dodatkowe czynniki powodujące powstawanie efektów ubocznych to: choroby układu krążenia (miażdżyca, niewydolność krążenia, choroba wieńcowa), jednoczesne stosowanie leków z grupy hormonów sterydowych, jednoczesne stosowanie leków zubożających sok żołądkowy i hamujących wydzielanie kwasu solnego przez żołądek, spożywanie alkoholu i palenie tytoniu [14].

Bardzo duża liczba chorych, u których zaobserwowano niekorzystne skutki uboczne stosowania niesteroidowych leków przeciwzapalnych, skłoniła naukowców do poszukiwania coraz to nowszych leków, pozbawionych tak niekorzystnej właściwości. Efektem tych poszukiwań było wynalezienie nowej grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych, wybiórczo blokujących enzym COX-1. Ta nowa grupa leków jest znacznie bezpieczniejsza w użyciu, dzięki redukcji w dużym stopniu negatywnych efektów ubocznych [7].

7.1. Kwas 2-fenylopropionowy

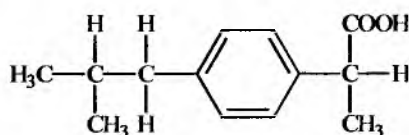


Rys.7.1.1. Wzór strukturalny kwasu 2-fenylopropionowego

Kwas 2-fenylpropionowy jest pochodną kwasu propionowego. W temperaturze pokojowej jest cieczą o gęstości 1.10 g/mL. Jego rozpuszczalność w wodzie wynosi 9.9 g/L. Krystalizuje w temperaturze -5°C, a jego temperatura wrzenia wynosi 144°C [15].

Kwas 2-fenylpropionowy posiada jeden asymetryczny atom węgla i dlatego występuje w postaci dwóch izomerów czynnych optycznie. Skręcalność właściwa formy prawoskrętnej wynosi +79.2° [16], a formy lewoskrętnej -80° [16], jednak żaden z tych optycznie czynnych izomerów nie posiada właściwości leczniczych. Na rynku związek dostępny jest w postaci mieszaniny racemicznej.

7.2. Ibuprofen



Rys.7.2.1. Wzór strukturalny ibuprofenu (kwasu α – metylo – 4 - (2 - metylopropylo) fenylpropanowego)

Ibuprofen (nazwy handlowe: mortin, rufen, advil, ibufen, ibuprofen, ibuprom, nurofen) jest pochodną kwasu propionowego. Jest to substancja stała, krystaliczna, nierozpuszczalna w wodzie, o temperaturze topnienia 77-78°C. Dobrze rozpuszcza się w rozpuszczalnikach organicznych, takich, jak etanol, dichlorometan i acetonitryl. Działa przeciwzapalnie, przeciwbólowo, przeciwreumatycznie oraz przeciwgorączkowo, dzięki hamowaniu syntezy prostaglandyn. Poprawia ruchomość stawów i usuwa uczucie zdrętwienia w stawach, a także zmniejsza obrzęki. Ponadto zmniejsza krzepliwość krwi, dzięki hamowaniu agregacji płytek krwi, a także hamuje działanie leków moczopędnych. Jego okres półtrwania wynosi 2 godziny. Ulega wchłonięciu z jelit do krwi w ciągu jednej godziny. Działanie przeciwbólowe ibuprofenu waha się w granicach od 4 do 6 godzin. Ibuprofen nie kumuluje się w organizmie i jest wydalany z moczem w ilości od 60 do 90 % w postaci metabolitów. Nie należy go podawać z innymi lekami zawierającymi salicylany, gdyż powoduje interakcję konkurencyjną. Do skutków ubocznych wywołanych przez ibuprofen należy zaliczyć przede wszystkim: bóle brzucha, nudności, wymioty, alergie, rzadziej biegunkę, obrzęki i zawroty głowy. Ibuprofen w postaci racemicznej podawany jest w dawkach od 1200 do 2400 mg na dobę. Dostępny jest on w postaci tabletek 200 i 400 mg, tabletek powlekanych 200, 400, 600, 800 i 1000 mg, kapsułek 300, 400 i 800 mg, tabletek

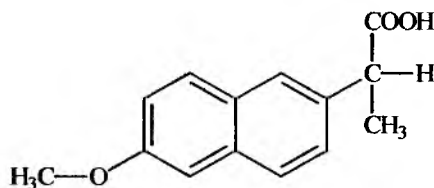
rozpuszczalnych 200, 400, 600 i 800 mg, czopków 500 i 542,2 mg, saszetek z granulatem 400 i 600 mg, syropu, zawiesiny, żelu 5-procentowego, kremu 5-procentowego i ampulek 800 mg. W preparatach złożonych występuje najczęściej z pseudoefedryną i kodeiną [17].

Ibuprofen posiada w swojej budowie asymetryczny atom węgla i dzięki temu jest związkiem optycznie czynnym. Może występować w dwóch konfiguracjach, z których jedna skręca płaszczyznę światła spolaryzowanego w lewo (-), a druga w prawo (+). Skręcalność właściwa dla formy prawoskrętnej wynosi $+53.2^\circ$ [18], a dla formy lewoskrętnej -57.5° [16].

Czysta odmiana prawoskrętna nazywa się deksibuprofenem. Został on wprowadzony do lecznictwa w postaci tabletek 150, 300 i 450 mg. Uważa się, że jest bezpieczniejszy od ibuprofenu w postaci racemicznej, gdyż jak zostało powiedziane wcześniej, jest właściwą formą aktywną, natomiast forma lewoskrętna jest nieaktywna [17].

Ibuprofen jest najlepiej tolerowanym lekiem z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych [19].

7.3. Naproksen



Rys.7.3.1. Wzór strukturalny naproksenu (kwasu 6 – metoksy – α – naftylooctowego)

Naproksen (nazwy handlowe: naproksyn, anaprox, aleve, anapran, apo-naproxen, naproxen, sandprox) jest pochodną kwasu propionowego. Jest substancją stałą, krystaliczną, nierozpuszczalną w wodzie, o temperaturze topnienia 155°C . Dobrze rozpuszcza się w rozpuszczalnikach organicznych, takich, jak etanol, ciekłe węglowodory i eter. Skręcalność właściwa dla enancjomeru S wynosi $+66.3^\circ$ [20], natomiast dla enancjomeru R -67.2° [20]. Jego okres półtrwania w organizmie ludzkim waha się w granicach od 17 do 30 godzin.

Naproksen zaliczany jest do niesteroidowych leków przeciwzapalnych, gdyż hamuje syntezę prostaglandyn i tromboksanu. Wywiera działanie przeciwzapalne, przeciwbólowe, przeciwartretyczne, przeciwreumatyczne i przeciwgorączkowe. Potęguje działanie leków przeciwzakrzepowych. Jest wchłaniany z jelit do krwi w ciągu jednej godziny po spożyciu i zostaje wydany z moczem zarówno w postaci niezmienionej jak i zmetabolizowanej. Do

licznych skutków ubocznych należy zaliczyć: zgagę, nudności, możliwość powstania wrzodów żołądka, zawroty głowy i szum w uszach. Może on także wywoływać wymioty, bóle brzucha, a czasami mogą dodatkowo wystąpić objawy alergiczne. Naproksenu nie powinno się podawać dzieciom, kobietom ciężarnym, kobietom karmiącym ani osobom z niewydolnością krążenia, wątroby i nerek, ze skazą krwotoczną, czy też z chorobą wrzodową. Naproksen powinien być podawany w dawkach terapeutycznych wynoszących średnio od 500 do 750 mg na dobę. Jest on dostępny w postaci tabletek 100, 250, 500 i 750 mg, tabletek powlekanych 250, 275, 500 i 550 mg, czopków 500 mg, ampułek 550 mg/5 ml z dodatkiem znieczulającej lidokainy, syropu i żelu [16].

7.4. Literatura

1. W. Rhys-Williams, F. McCarthy, J. Baker, Y.-F. Hung, M. J. Thomason, A. W. Lloyd, G. W. Hanlon, *Enzyme Microb. Tech.*, **22**, 281 (1998)
2. E. Stone, *Philos. T. Roy. Soc.*, **53**, 195 (1763)
3. H. Dreser, *Pflug. Arch.*, **76**, 306 (1899)
4. R. J. Flower, *Pharmacol. Rev.*, **26**, 33 (1974)
5. J. R. Vane, R. M. Botting, *Inflamm. Res.*, **47**, 78 (1998)
6. L. Stryer, *Biochemia*, PWN, Warszawa, 1997
7. D. Picot, P. J. Loll, R. M. Gravito, *Nature*, **367**, 243 (1994)
8. J. C. Fröhlich, *Ann. Rheum. Dis.*, **54**, 942 (1995)
9. P. M. Brooks, R. O. Day, *N. Engl. J. Med.*, **324**, 1716 (1991)
10. K. M. Williams, R. O. Day, R. D. Knihinicki, A. Duffield, *Biochem. Pharmacol.*, **35**, 3403 (1986)
11. P. Brooks, *Am. J. Med.*, **104**, 9 (1998)
12. M. J. S. Langman, J. Weil, P. Wainwright, *Lancet*, **343**, 1075 (1994)
13. S. E. Gabriel, L. Jaakkimainen, C. Bombardier, *Ann. Intern. Med.*, **115**, 787 (1991)
14. M. Bidaut-Russell, S. E. Gabriel, *Best Pract. Res. Cl. Ga.*, **15**, 739 (2001)
15. www.merck.com.pl
16. E. J. Ebbbers, G. J. A. Ariaans, A. Bruggink, B. Zwanenburg, *Tetrahedron-Asymmetr.*, **10**, 3701 (1999)
17. www.luskiewnik.gower.pl
18. T. Bando, Y. Namba, K. Shishido, *Tetrahedron-Asymmetr.*, **8**, 2159 (1997)
19. N. Moore, *Clin. Drug Invest.*, **18**, 89 (1999)
20. X. Yuan, J. Li, Y. Tian, G.-H. Lee, X.-M. Peng, R. Zhu, X. You, *Tetrahedron-Asymmetr.*, **12**, 3015 (2001)

8. Cel pracy

Celem niniejszej rozprawy było przebadanie możliwości adsorpcyjnej chromatografii cienkowarstwowej jako prostej i zarazem skutecznej techniki rozdzielczej w zakresie tzw. bezpośredniego rozdziału chromatograficznego wybranych par enancjomerów, tj. aromatycznych pochodnych kwasu propionowego. Badania te dotyczyły m.in. chiralnych połączeń o znaczeniu terapeutycznym (tj. ibuprofenu i naproksenu), należących do grupy niesteroidowych leków o właściwościach przeciwzapalnych i przeciwgorączkowych (ang. non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs).

Początkowo badania miały dotyczyć jedynie możliwości przeprowadzenia rozdziałów analitycznych wybranych par enancjomerów, jednak już wstępne wyniki dowiodły, iż adsorpcyjna chromatografia cienkowarstwowa może być z powodzeniem wykorzystana również do określonych badań o charakterze fizykochemicznym (m.in. do jakościowego rejestrowania zmian skręcalności optycznej enancjomerów w wyniku ich spontanicznej enancjomeryzacji). Po tych wstępnych ustaleniach zakres prowadzonych badań został rozszerzony i dotyczył nie tylko rozdziału wybranych par enancjomerów, ale także określonych zjawisk, związanych z długotrwałym przechowywaniem optycznie czystych enancjomerów w postaci roztworów w prostych i mieszanych rozpuszczalnikach niskocząsteczkowych.

9. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

9.1. Odczynniki i materiały

W badaniach przeprowadzonych techniką chromatografii cienkowarstwowej i wysokosprawnej chromatografii cieczowej wykorzystano odczynniki chemiczne i materiały, przedstawione w tabelach 9.1.1-9.1.3.

Tabela 9.1.1. Ogólna charakterystyka badanych analitów

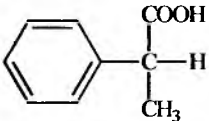
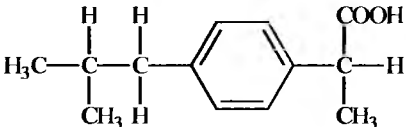
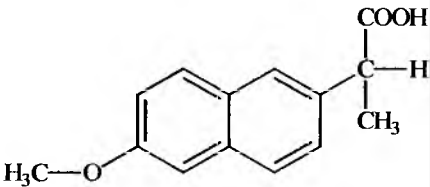
| Analit | Wzór chemiczny | Stopień czystości | Producent |
|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|----------------------------------------|
| Kwas <i>R,S</i> -(±)-2-fenylopropionowy |  | >98% | Merck, Darmstadt, Niemcy |
| <i>S</i> -(+)-Ibuprofen <i>R,S</i> -(±)-Ibuprofen |  | >98% | Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA |
| <i>S</i> -(+)-Naproksen |  | >98% | Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA |

Tabela 9.1.2. Ogólna charakterystyka cieczy stosowanych jako rozpuszczalniki analitów i/lub jako fazy ruchome w chromatografii cieczowej

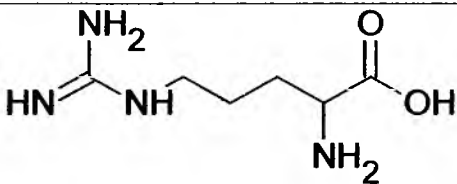
| Związek chemiczny | Wzór chemiczny | Stopień czystości | Producent |
|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------------------|
| Acetonitryl | CH_3CN | $\geq 99.9\%$ | Merck, Darmstadt, Niemcy |
| Metanol | CH_3OH | $\geq 99.9\%$ | Merck, Darmstadt, Niemcy |
| Etanol | $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ | $\geq 99.9\%$ | Merck, Darmstadt, Niemcy |
| Dichlorometan | CH_2Cl_2 | $\geq 99.9\%$ | Merck, Darmstadt, Niemcy |
| Sól fizjologiczna | Wodny roztwór NaCl (9mg/ml) | | Fresenius Kabi, Kutno, Polska |
| Lodowaty kwas octowy | CH_3COOH | $\geq 99.5\%$ | POCH, Gliwice, Polska |
| Roztwór buforowy, pH=9 | H_3BO_3 , KCl, NaOH | ± 0.05 (20°C) | POCH, Gliwice, Polska |
| L-Arginina |  | $\geq 99\%$ | Merck, Darmstadt, Niemcy |
| Zdeuterowany acetonitryl | CD_3CN | $\geq 99\%$ | POCH, Gliwice, Polska |
| Woda | H_2O | do HPLC | J. T. Baker |

Tabela 9.1.3. Podstawowa charakterystyka materiałów stosowanych jako fazy stacjonarne w chromatografii cieczowej

| Faza stacjonarna | Rodzaj chromatografii | Numer katalogowy | Producent |
|-----------------------------------------------------------------|-----------------------|------------------|--------------------------|
| Żel krzemionkowy 60 F ₂₅₄ (gotowe płytki szklane) | TLC | 1.05715 | Merck, Darmstadt, Niemcy |
| LiChrospher® 100, RP-18 | HPLC | 1.50983 | Merck, Darmstadt, Niemcy |

9.2. Sprzęt i aparatura

Poniżej przedstawiono wykaz sprzętu użytego podczas przeprowadzonych badań techniką chromatografii cienkowarstwowej i wysokosprawnej chromatografii cieczowej, a także przy pomocy polarymetrii, wiskozymetrii i spektroskopii magnetycznego rezonansu protonowego (^1H NMR):

- ✓ Densytometr CD 60 firmy Desaga (Heidelberg, Niemcy), wyposażony w program ProQuant firmy Desaga, współpracujący z systemem Windows. Densytogramy otrzymano w wyniku rejestracji zmian intensywności światła odbitego UV przy długości fali 210 nm (kwas 2-fenylpropionowy i ibuprofen) i 235 nm (naproksen). Rozmiary szczeliny wynosiły 0.02 mm x 0.4 mm, a także 2.0 mm x 0.1 mm (naproksen).
- ✓ Automatyczny aplikator próbek w chromatografii cienkowarstwowej (model AS-30) produkcji firmy Desaga;
- ✓ Chromatograf HPLC firmy Gynkotec (Germering, Niemcy) wyposażony w następujące elementy:
 - Autosampler: Gynkotec Gina 50;
 - Pompa: Gynkotec typ P 580A LPG;
 - Detektor: Gynkotec DAD UVD 340U;
 - Program do akwizycji i obróbki danych: Chromeleon.Dionex wersja 6.40;
 - Gotowa kolumna do HPLC LiChrospher 100, RP-18 (Merck, Darmstadt, Niemcy) o wymiarach 250 mm x 4 mm i o średniej średnicy ziarna 5 μm ;
 - Fiolki z zakrętką i membraną Chromacol 2 ml;
 - Pipety automatyczne Socorex 100-1000 μl .

Długość fali, przy której rejestrowano chromatogramy wynosiła 225 nm.

- ✓ Polarymetr, model Polamat A (Carl Zeiss, Jena, Niemcy);
- ✓ Spektrometr NMR 400 Hz (Bruker Avance, Billerica, USA);
- ✓ Wiskozymetr (lepkościomierz) Höpplera;
- ✓ Komora chromatograficzna wg Stahla, produkcji firmy Camag, Muttenz, Szwajcaria;
- ✓ Waga laboratoryjna Scaltec (model SBC 31) produkcji firmy Scaltec Instruments, Heiligenstadt, Niemcy;

- ✓ Kalibrowane kapilary do aplikacji próbek w chromatografii cienkowarstwowej produkcji firmy Camag;
- ✓ Drobný sprzęt laboratoryjny (kolby miarowe, pipety, mikrokapilary, termometr).

9.3. Metodyka prowadzonych badań

9.3.1. Badania prowadzone techniką TLC

W przeprowadzonych eksperymentach zastosowano różne układy chromatograficzne dla poszczególnych analitów chromatografowanych pojedynczo. Tabela 9.3.1.1 przedstawia ogólną charakterystykę układów chromatograficznych (m.in. stężenia badanych analitów i objętości nanoszonych próbek).

Roztwory badanych analitów nanoszono na płytki chromatograficzne następującymi sposobami:

- Ręcznie w postaci plamek przy użyciu mikrokapilar;
- Automatycznie w postaci plamek przy użyciu aplikatora.

Chromatogramy cienkowarstwowe były przeważnie rozwijane w wariancie jednokierunkowym, ale czasami także w wariancie dwukierunkowym.

Przed przystąpieniem do nanoszenia analitów płytki chromatograficzne przygotowano poprzez ich przedwstępne rozwijanie („pranie”) w roztworze zawierającym metanol i wodę w stosunku objętościowym 9:1. Następnie płytki suszono w temperaturze pokojowej przez okres 3 godzin. „Pranie” płytek miało na celu zwiększenie czułości rozdzielania. Wyprane i wysuszone płytki poddawano następnie impregnacji przez zanurzenie ich na około 2 sekundy w roztworze o stężeniu $3 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ L-argininy w metanolu. Dopiero tak przygotowane płytki chromatograficzne nadawały się do przeprowadzania eksperymentu.

W wariancie jednokierunkowego rozwijania chromatogramów badane anality (o określonej objętości roztworów) nanoszono na płytki chromatograficzne ręcznie (przy pomocy mikrokapilar) lub przy pomocy automatycznego aplikatora. Następnie chromatogramy rozwijano w komorze wg Stahla (po uprzednim nasyceniu jej przez okres 20 minut parami fazy ruchomej). Każdorazowo długość drogi migracji fazy ruchomej wynosiła 150 mm. Po rozwinięciu chromatogramy suszono, a następnie densytometrowano. W trakcie analizy mierzono czas rozwijania chromatogramu i temperaturę otoczenia. Badane anality przechowywano i chromatogramy rozwijano w dwóch różnych temperaturach, wynoszących odpowiednio $6 \pm 2^\circ\text{C}$ i $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Ibuprofen przechowywano przez okres 12 dni, natomiast naproksen i kwas 2-fenylopropionowy przez okres 5 dni. Badane anality chromatografowano dwa razy dziennie w odstępach pięciogodzinnych (ibuprofen w trakcie 12 dni

przechowywania nie był chromatografowany przez 1 dzień w środku serii). Każdy eksperyment był powtarzany co najmniej pięciokrotnie.

W wariancie dwukierunkowego rozwijania chromatogramów badany analit (ibuprofen lub naproksen o kreślonej objętości roztworu) наносzono na płytki chromatograficzne ręcznie (przy pomocy mikrokapilar) lub przy pomocy automatycznego aplikatora w postaci pojedynczej plamki w jednym z narożników płytki chromatograficznej. Następnie chromatogram rozwijano w wariancie jednokierunkowym w komorze wg Stahla (po uprzednim nasyceniu jej przez okres 20 minut parami fazy ruchomej). Każdorazowo długość drogi migracji fazy ruchomej wynosiła 150 mm. Po rozwinięciu chromatogram suszono, a następnie densytometrowano, po czym rozwijano chromatogram w drugim kierunku, prostym do rozwijania jednokierunkowego, w komorze wg Stahla, w tej samej fazie ruchomej. Każdorazowo długość drogi migracji fazy ruchomej wynosiła 150 mm. Analogicznie po rozwinięciu chromatogram suszono, a następnie skanowano densytometrycznie na szerokości 15 mm w odstępach 1 mm między poszczególnymi skanami. Każdy eksperyment był powtarzany co najmniej pięciokrotnie.

Tabela 9.3.1.1. Układy chromatograficzne TLC stosowane dla poszczególnych analitów

| Analit | Rozpuszczalnik analitu | Faza stacjonarna | Skład fazy ruchomej (v/v) | Stężenie analitów C_m [mol/dm ³] | Objętość próbki [[μl] |
|----------------------------------------------|---------------------------|------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------|
| Kwas $R,S-(\pm)$ -2-fenylpropionowy | 70% etanol | żel krzemionkowy impregnowany L-argininą | acetonitryl:metanol: woda (5:1:0.75) plus kilka kropli lodowatego kwasu octowego | ok. 6.5×10^{-3} | 5 |
| | dichlorometan | | | ok. 6.5×10^{-3} | 5 |
| | sól fizjologiczna | | | ok. 3.2×10^{-3} | 10 |
| $S-(+)$ -Ibuprofen $R,S-(\pm)$ -Ibuprofen | 70% etanol | żel krzemionkowy impregnowany L-argininą | acetonitryl:metanol: woda (5:1:1) plus kilka kropli lodowatego kwasu octowego | ok. 5.8×10^{-3} | 10 |
| | dichlorometan | | | ok. 5.8×10^{-3} | 5 |
| | sól fizjologiczna | | | ok. 1.4×10^{-3} | 10 |
| $S-(+)$ -Naprosen | 70% etanol | żel krzemionkowy impregnowany L-argininą | acetonitryl:metanol: woda (5:1:1.5) plus kilka kropli lodowatego kwasu octowego | ok. 4.3×10^{-3} | 5 |
| | dichlorometan | | | ok. 4.3×10^{-3} | 5 |
| | sól fizjologiczna | | | ok. 1.1×10^{-3} | 10 |

9.3.2. Badania prowadzone techniką HPLC

W ramach przeprowadzonych badań zastosowano także technikę HPLC. W tym celu wykorzystano chromatograf ciekłowy, opisany w podpunkcie 9.2. Tabela 9.3.2.1 przedstawia charakterystykę zastosowanych układów i warunków chromatografowania.

Tabela 9.3.2.1. Układy chromatograficzne HPLC stosowane dla poszczególnych analitów

| Analit | Rozpuszczalnik analitu | Faza stacjonarna | Skład fazy ruchomej (v/v) | Stężenie analitu $C_m[\text{mol/dm}^3]$ | Prędkość przepływu fazy ruchomej [ml/min] | Temperatura pracy kolumny [°C] ([K]) | Objętość próbki [[μl] |
|-----------------|---------------------------|---------------------|---------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------|
| S-(+)-Ibuprofen | 70% etanol | RP-18 | acetonitryl | 9.7×10^{-3} | 0.6 | 22±2 (295±2) | 5 |
| | acetonitryl | | acetonitryl/ woda (6:4) | | | | |
| S-(+)-Naproksen | acetonitryl | RP-18 | acetonitryl | 8.7×10^{-3} | 0.6 | 22±2 (295±2) | 5 |

9.3.3. Badania prowadzone z wykorzystaniem polarymetrii

Zastosowanie polarymetrii pozwoliło uzyskać informacje na temat zmian skręcalności właściwej roztworów badanych analitów w czasie ich przechowywania. Badane anality przechowywano w dwóch różnych temperaturach $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ i $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ przez okres pięciu godzin.

Tabela 9.3.3.1 przedstawia charakterystykę stosowanych układów i warunków prowadzenia eksperymentów z zastosowaniem polarymetrii.

Tabela 9.3.3.1. Stosowane układy i warunki prowadzenia eksperymentów z zastosowaniem polarymetrii

| Analit | Rozpuszczalnik analitu | Stężenie analitu C_m [mol/dm ³] | Długość fali [nm] | Długość kuwety [cm] | Objętość próbki [ml] |
|-------------------------------------|---------------------------|--------------------------------------------------|-------------------|------------------------|----------------------------|
| Kwas $R,S-(\pm)$ -2-fenylpropionowy | 70% etanol | 3.33 | 589 | 10 | 1 |
| | dichlorometan | | | | |
| $S-(+)$ -Ibuprofen | 70% etanol | 0.25 | 589 | 10 | 1 |
| | dichlorometan | | | | |
| $S-(+)$ -Naprosen | 70% etanol | 5.4×10^{-2} | 589 | 10 | 1 |
| | dichlorometan | | | | |

Tabela 9.3.3.1. (ciąg dalszy)

| Analit | Rozpuszczalnik analitu (v/v) | Stężenie analitu C_m [mol/dm ³] | Długość fali [nm] | Długość kuwety [cm] | Objętość próbki [ml] |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------------|------------------------|----------------------------|
| S-(+)-Naproksen | etanol-woda- lodowaty kwas octowy (7:2.5:0.5, 7:2:1, 7:1.5:1.5, 7:1:2, 7:0.5:2.5, 7:0:3) | 5.4×10^{-2} | 589 | 10 | 1 |
| S-(+)-Naproksen | etanol-woda- roztwór buforowy o pH=9 (7:2.5:0.5, 7:2:1, 7:1.5:1.5, 7:1:2, 7:0.5:2.5, 7:0:3) | 5.4×10^{-2} | 589 | 10 | 1 |

9.3.4. Badania prowadzone techniką ^1H NMR (spektroskopia magnetycznego rezonansu protonowego)

Do przeprowadzenia badań zastosowano spektrometr NMR. Badania były prowadzone w dwóch różnych wariantach: (i) z użyciem obrotowego zgłębnika i (ii) z użyciem nieruchomego zgłębnika. Badaną próbką był roztwór *S*-(+)-ibuprofenu (5 mg/ml) w zdeuterowanym acetonitrylu (CD_3CN).

9.3.5. Badanie lepkości

Przy pomocy wiskozymetru (lepkościomierza) Höpplera wyznaczono lepkość czystych rozpuszczalników i roztworów *S*-(+)-naproksenu w tych rozpuszczalnikach. Pomiary były przeprowadzone w temperaturze $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$. Każdy eksperyment był powtarzany dziesięciokrotnie. W tabeli 9.3.5.1 przedstawiono warunki, w jakich zostały przeprowadzone pomiary lepkości.

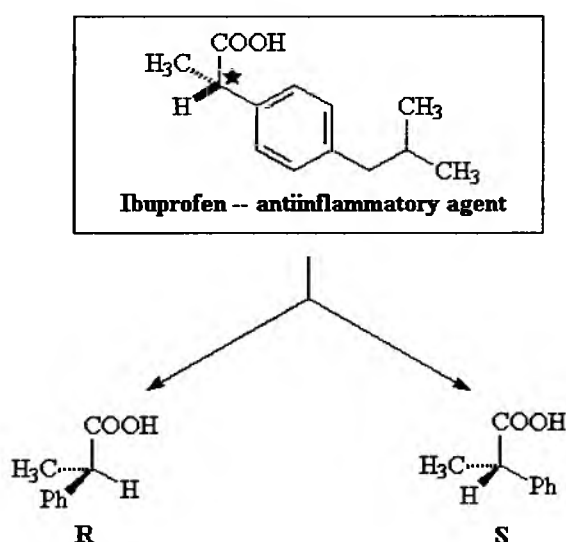
Tabela 9.3.5.1. Układy stosowane w pomiarach lepkości

| Analit | Rozpuszczalnik | Stężenie analitu C_m [mol/dm ³] |
|-------------------------|----------------|--------------------------------------------------|
| - | acetonitryl | 0 |
| <i>S</i> -(+)-Naproksen | acetonitryl | 4.3×10^{-3} |
| <i>S</i> -(+)-Naproksen | acetonitryl | 2.15×10^{-3} |
| - | 70% etanol | 0 |
| <i>S</i> -(+)-Naproksen | 70% etanol | 4.3×10^{-3} |
| <i>S</i> -(+)-Naproksen | 70% etanol | 2.15×10^{-3} |

9.4. Wyniki badań i ich omówienie

9.4.1. Opracowanie nowoczesnych warunków rozdzielania enancjomerów ibuprofenu techniką adsorpcyjnej chromatografii cienkowarstwowej na podstawie danych literaturowych

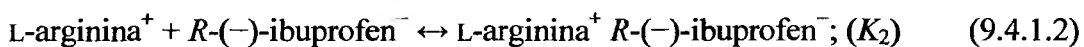
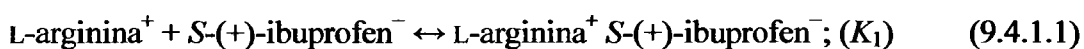
Punktem wyjścia do rozważań nad możliwością opracowania nowych warunków rozdzielania enancjomerów ibuprofenu (rys.9.4.1.1) było postanowienie zastosowania do tego celu adsorpcyjnej chromatografii cienkowarstwowej.



Rys.9.4.1.1. Wzór strukturalny ibuprofenu i przedstawienie jego chiralności

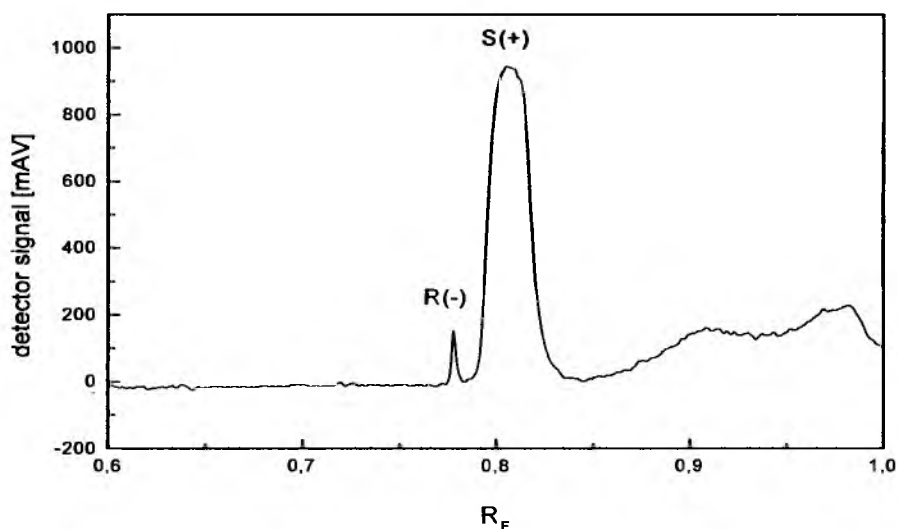
Z doniesień literaturowych wynikało, że zastosowanie tej techniki do rozdzielania enancjomerów jest stosunkowo najmniejsze. Natomiast te artykuły, jakie się dotychczas ukazały, dotyczyły rozdzielów enancjomerycznych z zastosowaniem ręcznie powlekanych płytek chromatograficznych. Z sytuacją taką spotykamy się m.in. w opublikowanym przez Bhushana i Parshada [1] krótkim komunikacie z 1996 roku. Komunikat ten przedstawiał udany rozdział enancjomerów ibuprofenu przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej i stanowił jedyną tego typu udaną próbę rozdzielania enancjomerów ibuprofenu tą właśnie techniką. Autorzy wzmiankowanej pracy wykorzystali do tego celu szklane płytki ręcznie pokryte żelom krzemionkowym, zawierającym dodatek L-argininy jako czynnika chiralnego. Grubość naniesionego adsorbentu wynosiła 0.5 mm. Zastosowana faza ruchoma miała następujący skład: acetonitryl – metanol – woda, w stosunku objętościowym 5:1:1. Ponadto

do fazy ruchomej dodawano parę kropli lodowatego kwasu octowego, w celu uzyskanie pH roztworu o wartości niższej, aniżeli punkt izoelektryczny L-argininy, wynoszący ok. 11,2. W dostatecznie kwaśnym środowisku L-arginina nie występuje w postaci jonu obojnaczego czy też w postaci anionu, lecz w postaci kationu zawierającego grupy -NH_3^+ . Dzięki tak przygotowanej fazie stacjonarnej możliwy był do osiągnięcia rozdział dwóch antypodów ibuprofenu. Mechanizm tego rozdziału jest wynikiem dysocjacji elektrolitycznej grupy karboksylowej obu izomerów ibuprofenu w rozpuszczalnikach zawierających w swoim składzie wodę (co prowadzi do powstania anionów -COO^-), a następnie utworzenia dwóch diastereomerycznych soli, (+)(-) i (-)(-) z L-argininą, co jest kluczowym krokiem tej procedury. Poniżej przedstawiono dwa równania, opisujące ten mechanizm:



Podstawowym warunkiem uzyskania rozdziału jest nierówność stałej równowagi pierwszej reakcji, K_1 , względem stałej równowagi reakcji drugiej, K_2 , ($K_1 \neq K_2$). Dzięki opisanej wyżej metodzie, Bhushan i Parshad uzyskali stosunkowo ograniczony rozdział dwóch enancjomerów ibuprofenu, stosując przy tym technikę dwukierunkowego rozwijania chromatogramów. Różnica między współczynnikami opóźnienia R_F poszczególnych antypodów nie była zbyt duża i wynosiła jedynie 0.03. Do wizualizacji chromatogramów użyto w tym przypadku par jodu i nie uzyskano żadnego bezpośredniego dowodu na rzeczywistą obecność dwóch antypodów w dwóch uwidocznionych pasmach.

Brak przekonującego dowodu na istnienie dwóch antypodów ibuprofenu w dwóch rozdzielonych przez Bhushana i Parshada pasmach stał się głównym powodem podjętych przez nas badań. W przeprowadzonym eksperymencie zastosowano komercyjnie dostępne płytki chromatograficzne pokryte żelom krzemionkowym, którego grubość wynosiła 0.25 mm. Płytki te zaimpregnowano metanolem roztworem L-argininy w taki sposób, aby uzyskać porównywalną zawartość tego aminokwasu w warstwie żelu z adsorbentem preparowanym przez Bhushana i Parshada. Ponadto jako analit użyto mieszaninę obu antymerów ibuprofenu (czyli S,R -(±)-ibuprofen) [2]. Do oceny rozdziału dwóch enancjomerów ibuprofenu zastosowano densytometrię. Na rysunku 9.4.1.2 przedstawiono typowy densytogram otrzymany po jednokierunkowym rozwinięciu chromatogramu.



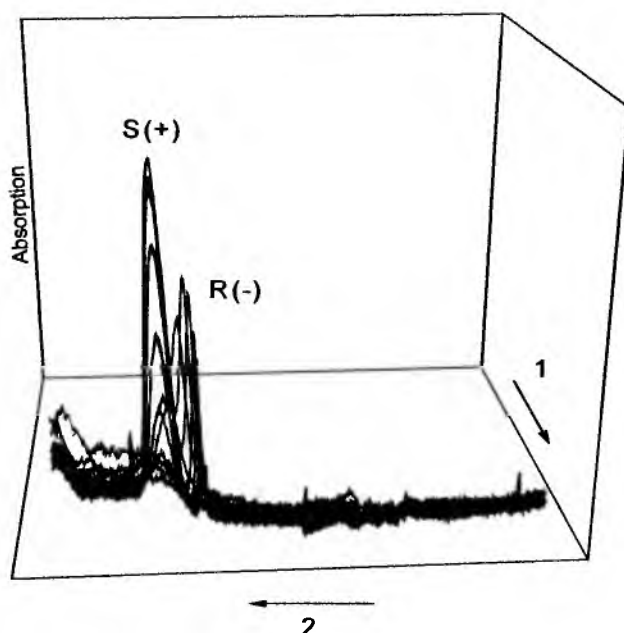
Rys.9.4.1.2. Densytogram otrzymany po jednokierunkowym rozwinięciu z zaznaczonymi pozycjami obu antypodów ibuprofenu

Na rysunku 9.4.1.2 wyraźnie widać pozycje *S*-(+)-ibuprofenu i *R*-(-)-ibuprofenu. Na podstawie uzyskanego densytogramu wyznaczono współczynnik opóźnienia R_F dla obu enancjomerów. Wartość współczynnika opóźnienia dla *S*-(+)-ibuprofenu wynosiła $0.82 (\pm 0.02)$, natomiast dla *R*-(-)-ibuprofenu $0.79 (\pm 0.02)$. Otrzymane wyniki są zgodne z wynikami otrzymanymi przez Bhushana i Parshada (w ich przypadku wartość współczynnika opóźnienia dla *S*-(+)-ibuprofenu wynosiła 0.80 , natomiast dla *R*-(-)-ibuprofenu 0.77), jednak Bhushan i Parshad uzyskali taki wynik dopiero po dwukierunkowym rozwinięciu chromatogramów.

Rozwinięcie chromatogramu w drugim kierunku (rys.9.4.1.3) umożliwia lepszy rozdział dwóch antypodów ibuprofenu. Otrzymane w ten sposób wartości współczynnika R_F wskazują na większą efektywność rozdzielanych enancjomerów. Poszczególne wartości współczynnika opóźnienia R_F przedstawiają się w sposób następujący:

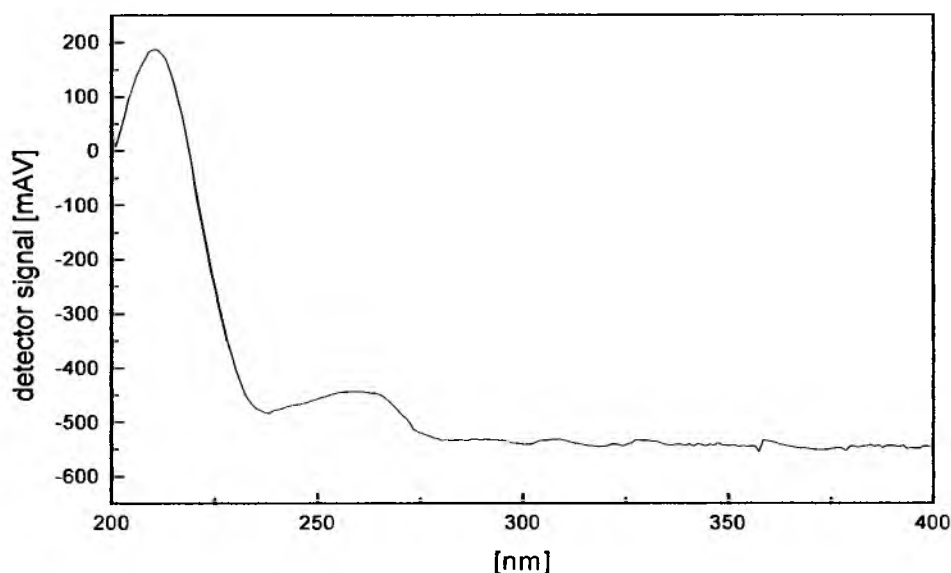
- ✓ $0.83 (\pm 0.02)$ dla *S*-(+)-ibuprofenu;
- ✓ $0.76 (\pm 0.02)$ dla *R*-(-)-ibuprofenu.

Zatem widać wyraźnie, że w niniejszych badaniach udało się nie tylko odtworzyć warunki eksperymentalne zaproponowane przez Bhushana i Parshada, ale także uzyskać efektywniejszy rozdział, w którym różnica między współczynnikami opóźnienia R_F obu enancjomerów ibuprofenu wynosiła 0.07 .



Rys.9.4.1.3. Trójwymiarowy schemat rozdziału dwóch enancjomerów ibuprofenu, uzyskanego dzięki dwukierunkowemu rozwinięciu chromatogramu. Płytkę chromatograficzną była skanowana densytometrycznie w drugim kierunku rozwijania chromatogramu na szerokości 15 mm w odstępach 1 mm między poszczególnymi skanami

Najistotniejszym dowodem, świadczącym o pełnym rozdziale dwóch enancjomerów ibuprofenu jest jednak identyfikacja rozdzielonych pasm poprzez rejestrację i porównanie widm absorpcyjnych UV dla obu tych pasm. Zastosowanie densytometrycznej techniki detekcji umożliwia rejestrację widm absorpcyjnych substancji rozdzielonych bezpośrednio na adsorbencie, czyli „in situ”. W niniejszym przypadku należało spodziewać się dwóch identycznych widm absorpcyjnych. Rzeczywiście uzyskano identyczne pod względem jakościowym widma absorpcyjne UV dwóch pasm chromatograficznych przedstawionych na rysunkach 9.4.1.2 i 9.4.1.3. Na rysunku 9.4.1.4 przedstawiono widmo UV dla *R*(-)-ibuprofenu, jako dla tego, który występował w mniejszej ilości w rozdzielanej mieszaninie, stąd też trudniej było je otrzymać. Widmo przedstawione na rysunku 9.4.1.4 jest identyczne z tym, jakie otrzymano dla chromatograficznego pasma *S*(+)-ibuprofenu. Jedyna różnica między obu widmami polegała na różnej intensywności pasm absorpcyjnych, co jest bezpośrednio związane z ilością poszczególnych antypodów zawartych w danym paśmie chromatograficznym. Otrzymane widma absorpcyjne dostarczają bardzo istotnych dowodów na rzeczywistą obecność dwóch enancjomerów ibuprofenu w rozdzielanej próbce.



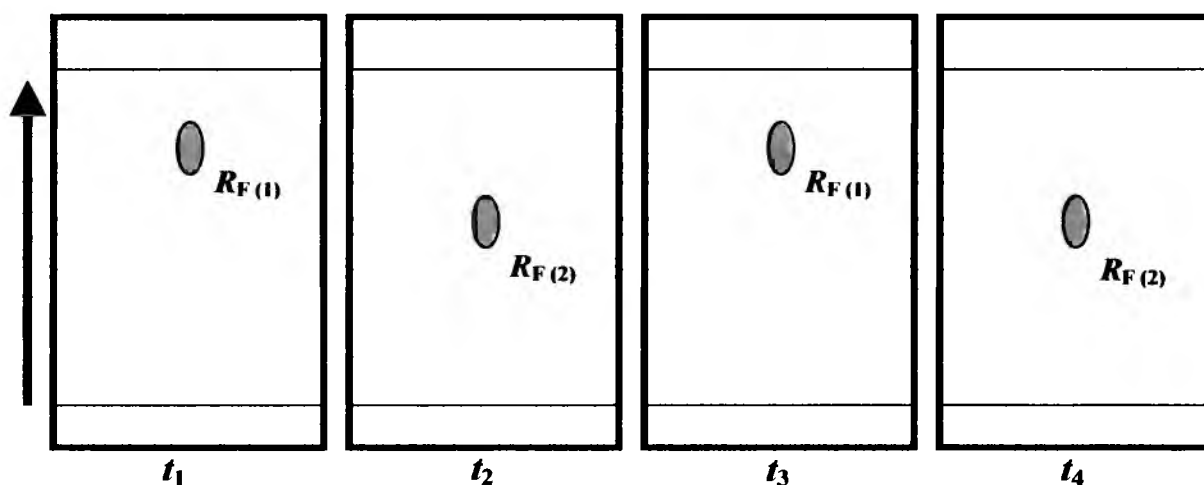
Rys.9.4.1.4. Widmo absorpcyjne UV *R*-(-)-ibuprofenu przedstawione na rysunkach 9.4.1.2 i 9.4.1.3, zarejestrowane densytometrycznie „in situ”

Nowoczesnymi elementami przeprowadzonego rozdzielania chromatograficznego, a następnie oceny uzyskanego rezultatu rozdzielczego było: (i) wykorzystanie komercyjnych płytek chromatograficznych o lepszej standaryzacji warstwy adsorbenta, aniżeli w przypadku płytek ręcznie powlekanych adsorbentem w laboratorium chemicznym; (ii) wykorzystanie nowoczesnej detekcji densytometrycznej, w pewnym stopniu umożliwiającej identyfikację rozdzielanych substancji „in situ” (co jest praktycznie niemożliwe w przypadku wizualizacji chromatogramów przy pomocy par jodu, czy też innymi sposobami tradycyjnymi).

9.4.2. Oscylacyjne zmiany wartości współczynnika opóźnienia (R_F) oraz skręcalności właściwej ($[\alpha]_D$) wybranych profenów podczas ich przechowywania w roztworze etanolowo-wodnym

W podrozdziale 9.4.1. został przedstawiony udany rozdział enancjomerów $S,R-(\pm)$ -ibuprofenu techniką chromatografii cienkowarstwowej [2]. Jak już zostało wspomniane wcześniej, ibuprofen jest pochodną kwasu 2-fenylopropionowego i zaliczamy go do grupy kwasów 2-arylopropionowych, tzw. profenów. Rozdział profenów jest obecnie uważany za szczególnie ważne przedsięwzięcie, ponieważ należą one do najchętniej używanych niesteroidowych leków przeciwzapalnych, które są podawane w postaci mieszanin racemicznych.

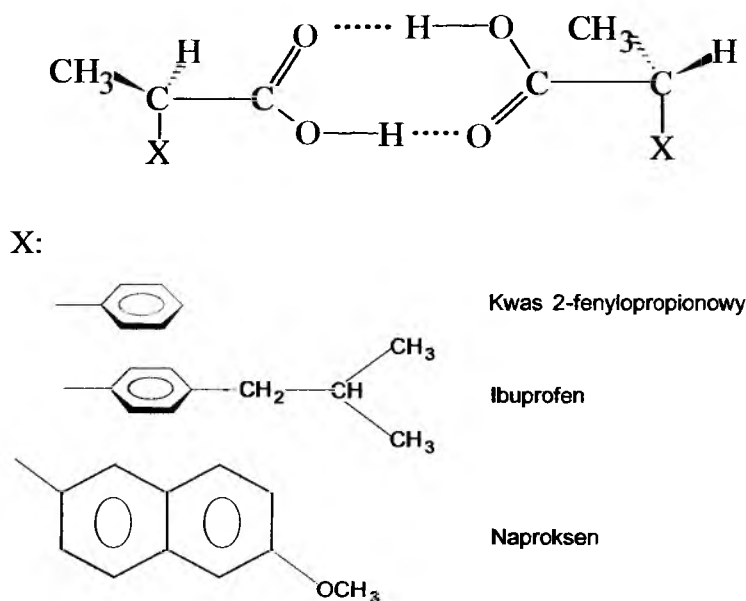
Jednakże rozdział przedstawiony w podrozdziale 9.4.1. nie zawsze jest możliwy do przeprowadzenia, ponieważ dłuższe (np. kilkugodzinne, czy kilkudniowe) przechowywanie $S,R-(\pm)$ -ibuprofenu w 70% roztworze wodnym etanolu prowadzi do zaniku dwóch dobrze rozdzielonych pasm chromatograficznych, a zamiast nich pojawia się pojedyncze, niesymetryczne pasmo chromatograficzne ibuprofenu o ruchomej wartości współczynnika opóźnienia R_F . Na następujących po sobie chromatogramach pojedyncze, niesymetryczne pasmo chromatograficzne ibuprofenu uzyskuje stale zmieniającą się pozycję, w zależności od czasu przechowywania próbki. Takie zachowanie wywołuje wrażenie „oscylacji” pozycji pasma, gdyż obserwujemy tutaj naprzemienne zmiany pozycji odpowiadające konfiguracji przestrzennej S i R . Schematycznie zjawisko to zostało przedstawione na rysunku 9.4.2.1.



Rys.9.4.2.1. Schematyczne przedstawienie oscylacyjnych zmian wartości współczynnika opóźnienia R_F dla ibuprofenu jako zależność przechowywania jego roztworu w 70% etanolu od czasu

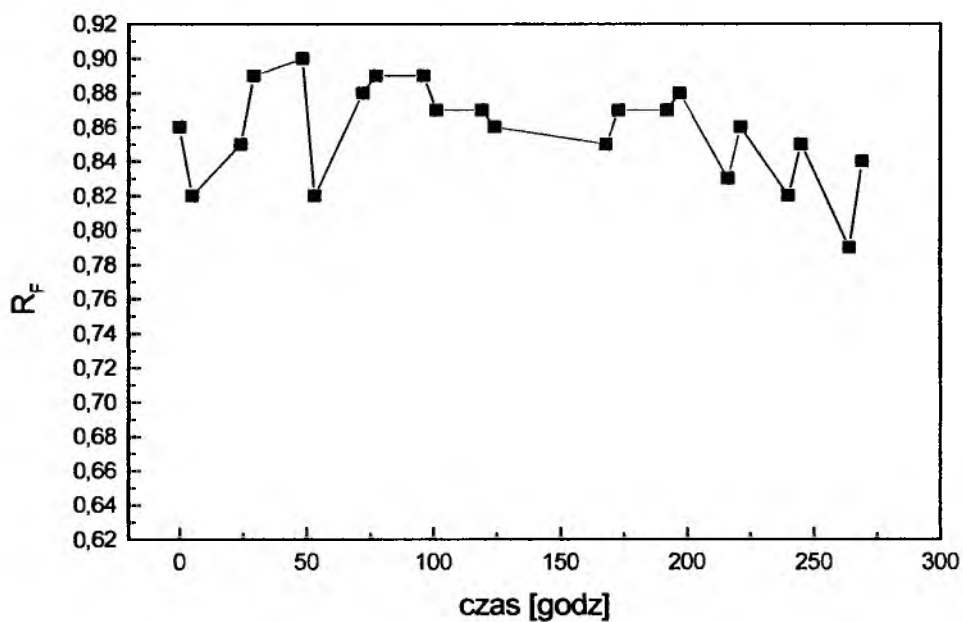
Zatem już w początkowej fazie przeprowadzonego eksperymentu pojawiło się wiele pytań dotyczących rzeczywistej natury obserwowanego zjawiska. Jednym z najważniejszych było pytanie o trwałość ibuprofenu podczas prowadzenia procesu rozdzielania. Ostatecznie doszliśmy do przekonania, że ibuprofen nie ulega rozkładowi, redukcji, czy też innym destrukcyjnym przemianom chemicznym podczas trwania eksperymentu, a obserwowane oscylacje są faktycznie wynikiem zmiany konfiguracji *S* na *R* i odwrotnie. Wniosek taki udało się wyciągnąć dzięki rejestracji widm UV in situ, co zgodnie z naszym stanem wiedzy jest pierwszą tego rodzaju próbą [3], a także dzięki dodatkowym badaniom, przeprowadzonym techniką HPLC. Ponadto literatura farmaceutyczna obfituje we wzmianki o praktycznej niezniszczalności profenów w roztworach.

Zmiana pozycji pasma chromatograficznego również prawdopodobnie może się zdarzyć w wyniku tworzenia się cyklicznych dimerów między *S*-(+)-ibuprofenem, a *R*-(-)-ibuprofenem. Oddziaływania przy pomocy wiązań wodorowych mogą w pewnych warunkach uniemożliwiać chromatograficzny rozdział dwóch antymerów danego związku [4].

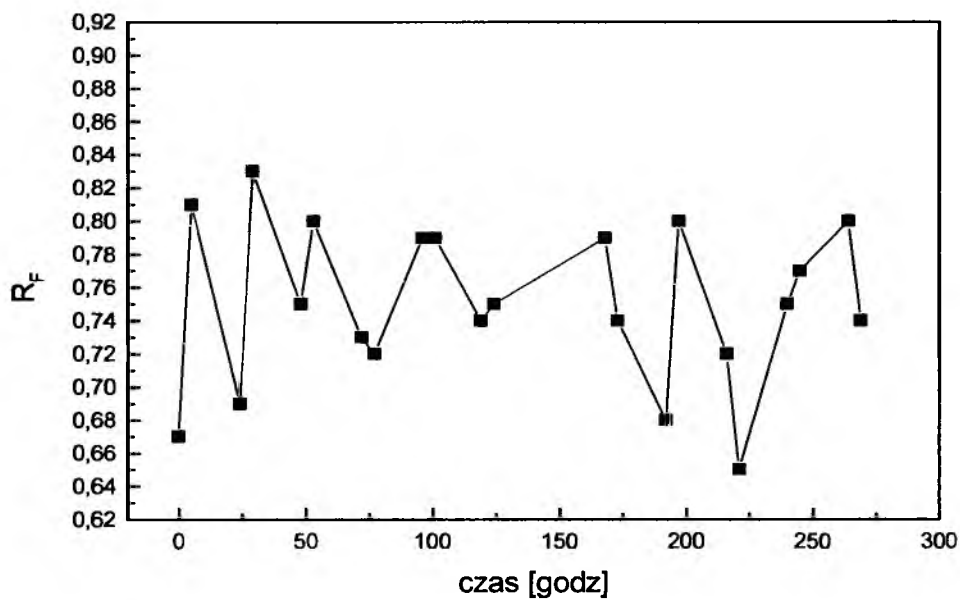


Rys.9.4.2.2. Schemat przedstawiający tworzenie się cyklicznych dimerów wybranych profenów przy pomocy wiązań wodorowych

W dalszej części przeprowadzonego eksperymentu badanymi analitami były następujące związki: *S*-(+)-ibuprofen, *S*-(+)-naprosken i kwas *S*,*R*-(±)-2-fenylpropionowy. Poniżej przedstawiono wyniki dotyczące zmiany współczynników opóźnienia R_F w zależności od czasu przechowywania roztworów dla tych właśnie związków.

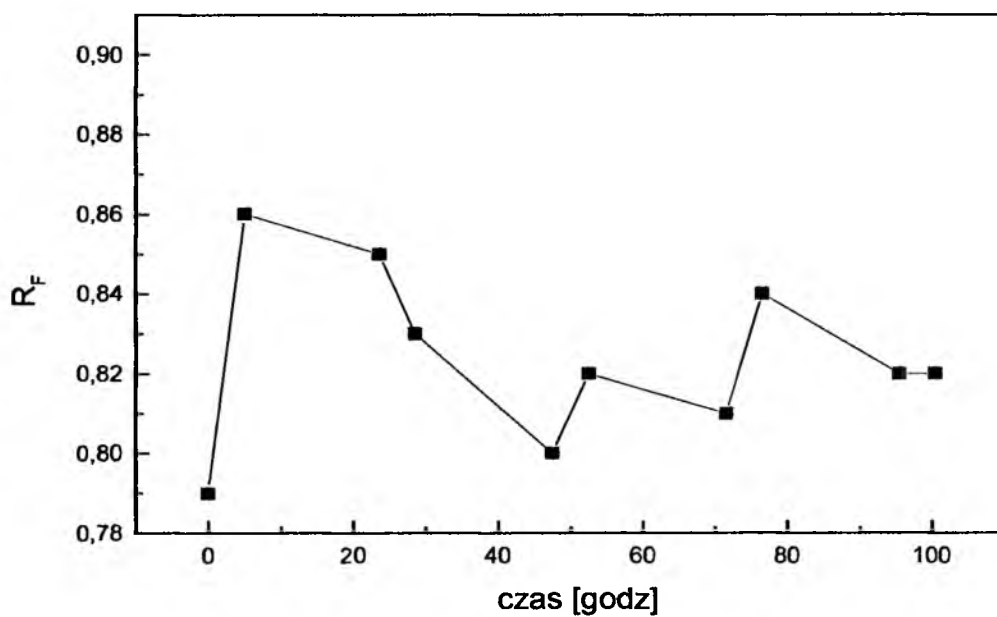


(a)

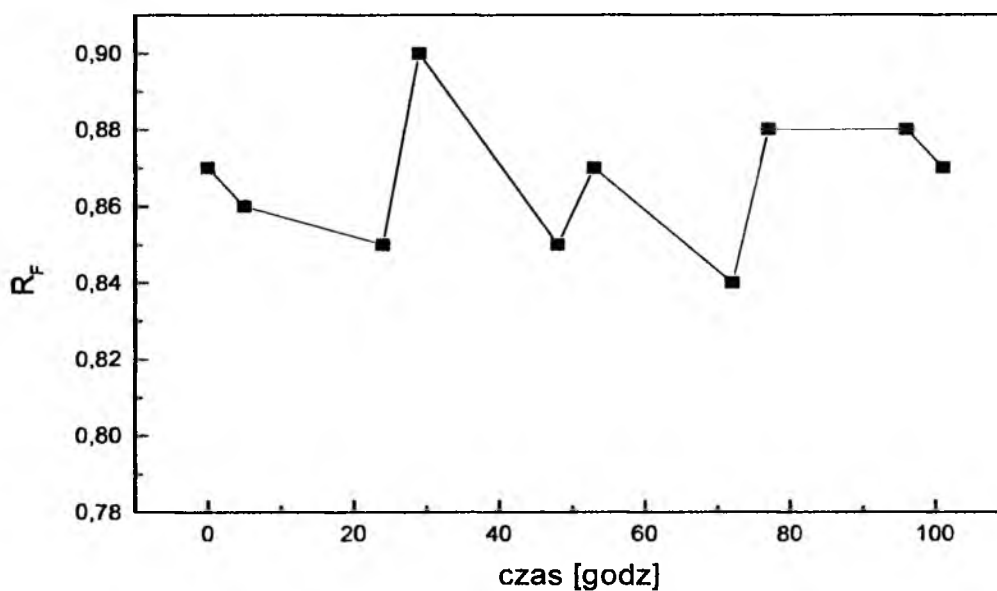


(b)

Rys.9.4.2.3. Zmiany wartości współczynnika opóźnienia R_F dla *S*-(+)-ibuprofenu w zależności od czasu przechowywania próbki roztworu w 70% roztworze wodnym etanolu w temperaturach (a) $22 \pm 2^\circ\text{C}$ i (b) $6 \pm 2^\circ\text{C}$

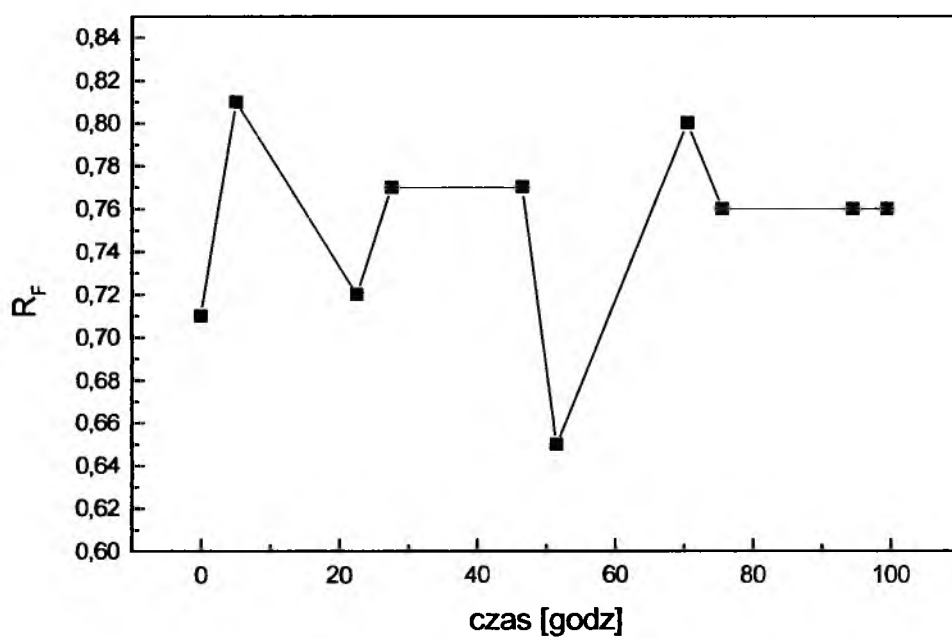


(a)

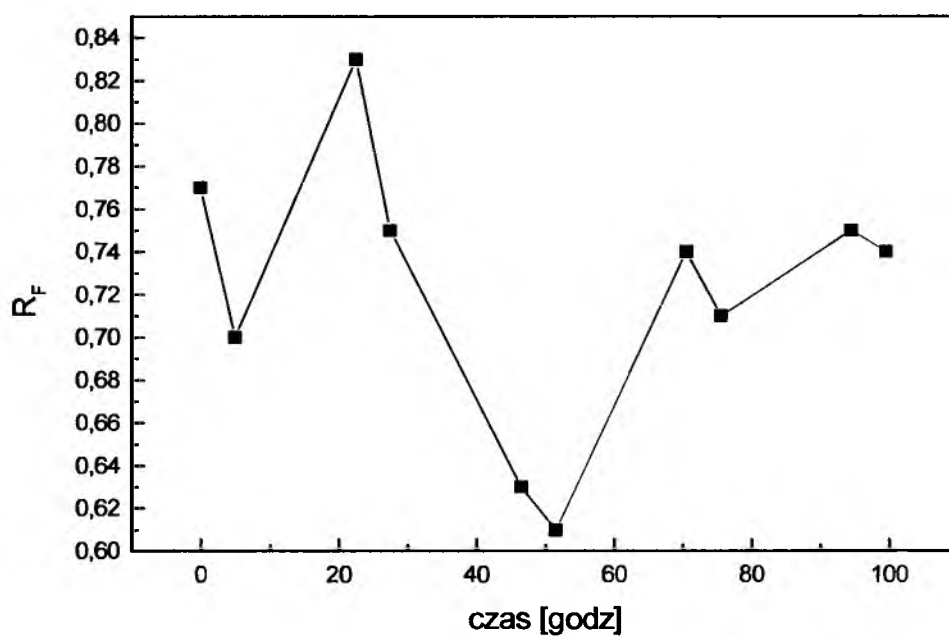


(b)

Rys.9.4.2.4. Zmiany wartości współczynnika opóźnienia R_F dla S-(+)-naproksenu w zależności od czasu przechowywania próbki roztworu w 70% roztworze wodnym etanolu w temperaturach (a) $22\pm 2^\circ\text{C}$ i (b) $6\pm 2^\circ\text{C}$



(a)

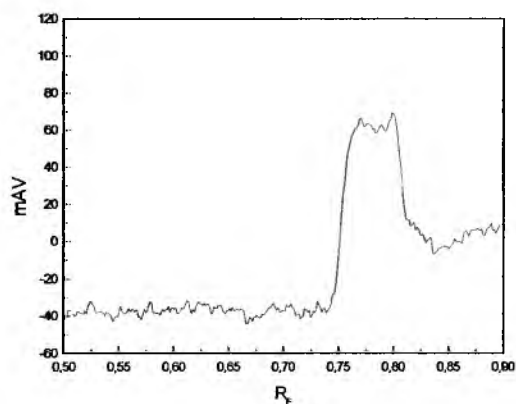


(b)

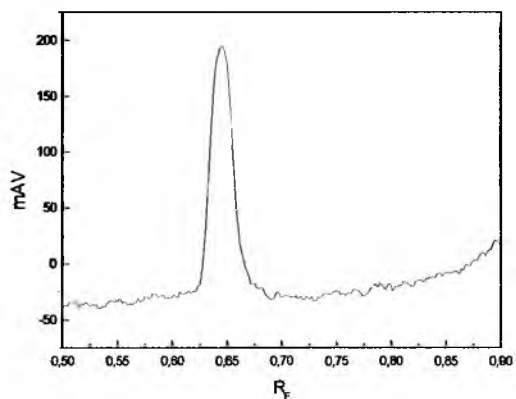
Rys.9.4.2.5. Zmiany wartości współczynnika opóźnienia R_F dla kwasu *S,R*-(±)-2-fenylpropionowego w zależności od czasu przechowywania próbki roztworu w 70% roztworze wodnym etanolu w temperaturach (a) $22\pm 2^\circ\text{C}$ i (b) $6\pm 2^\circ\text{C}$

Na rysunkach 9.4.2.3-9.4.2.5 zostało przedstawione zaskakujące zjawisko oscylacyjnych zmian współczynnika opóźnienia R_F w czasie, występujące w dwóch różnych temperaturach. Analizując przedstawione wyniki należy podkreślić, że obserwowane oscylacje nie wynikają z błędu zastosowanej techniki, czyli chromatografii cienkowarstwowej, gdyż błąd tej metody nie przekracza ± 0.02 wartości współczynnika opóźnienia R_F , a otrzymane przez nas wyniki znacznie wykraczają poza ten właśnie przedział wartości. Porównując wyniki otrzymane dla poszczególnych profenów można dodatkowo stwierdzić, że oscylacje występujące w niższej temperaturze mają większą amplitudę, aniżeli te zaobserwowane w temperaturze wyższej.

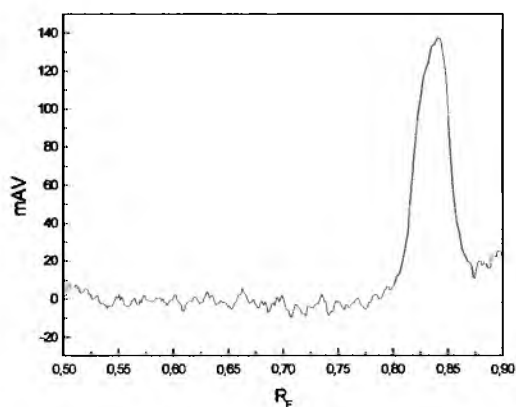
Na rysunku 9.4.2.6 przedstawiono kolejno po sobie następujące zmiany profili stężeniowych, odpowiadające zmianom wartości współczynnika opóźnienia R_F , w postaci serii „stop-klatek” (co już wcześniej schematycznie przedstawiono na rysunku 9.4.2.1). Zaobserwowane zmiany profili stężeniowych są charakterystyczne dla wszystkich badanych przez nas profenów, natomiast te przykładowo przedstawione na rysunku 9.4.2.6 są profilami stężeniowymi kwasu *S,R*-(\pm)-2-fenylopropionowego. Analizując zmiany kształtu profili stężeniowych oraz zmiany pozycji maksimum tych profili, przedstawione na rysunku 9.4.2.6, doszliśmy do przekonania, iż mogą one wynikać z przestrzennej transformacji strukturalnej jednego enancjomeru w swoje zwierciadlane odbicie, czyli w antymer.



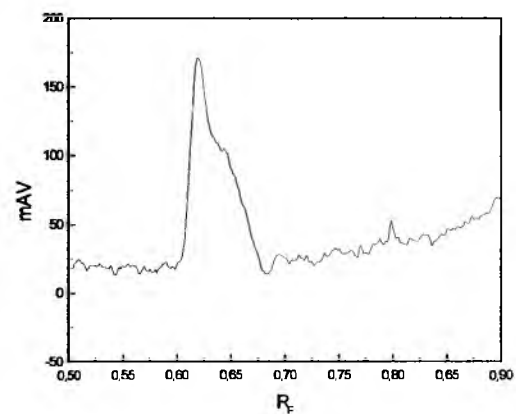
(a)



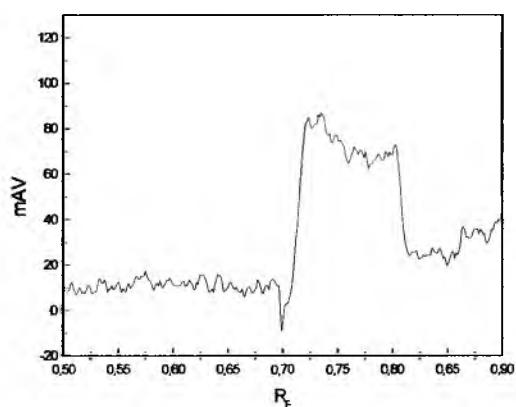
(d)



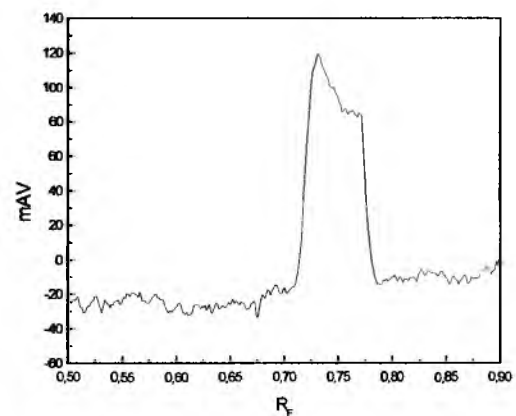
(b)



(e)



(c)



(f)

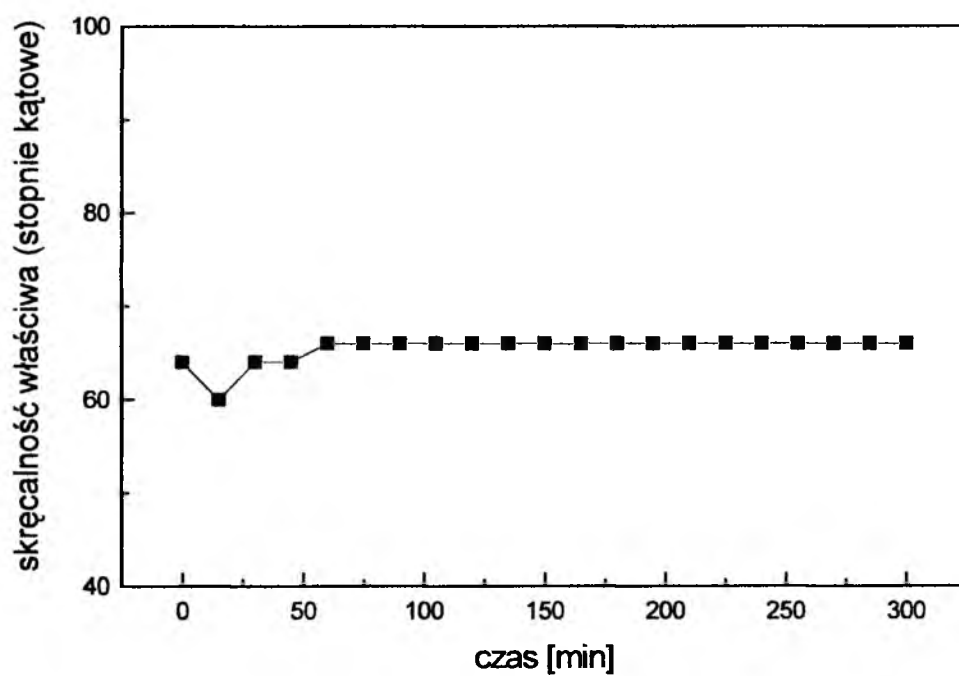
Rys.9.4.2.6. Zmiany profili stężeniowych kwasu $S,R(\pm)$ -2-fenylpropionowego w czasie jego przechowywania w temperaturze $22 \pm 2^\circ\text{C}$ (a) 0 godzin (mieszanina racemiczna); (b) 22.5 godziny (enancjomer $S(+)$); (c) 27.5 godziny (mieszanina racemiczna); (d) 46.5 godziny (enancjomer $R(-)$); (e) 51.5 godziny (przesunięcie równowagi od enancjomeru $R(-)$ w kierunku mieszaniny racemicznej); (f) 70.5 godziny (mieszanina racemiczna). Zmiany profili stężeniowych towarzyszą zmianom wartości współczynnika opóźnienia R_F

Najprostszym sposobem stwierdzenia, czy rzeczywiście w roztworach etanolowo-wodnych rozpatrywanych profenów zachodzi spontaniczna zmiana konfiguracji przestrzennej było przeprowadzenie stosownych badań polarymetrycznych. Mianowicie mierzono skręcalność właściwą $[\alpha]_D$ każdego z wybranych profenów w funkcji czasu [3], a wyniki badań przedstawiono na rysunkach 9.4.2.7-9.4.2.9.

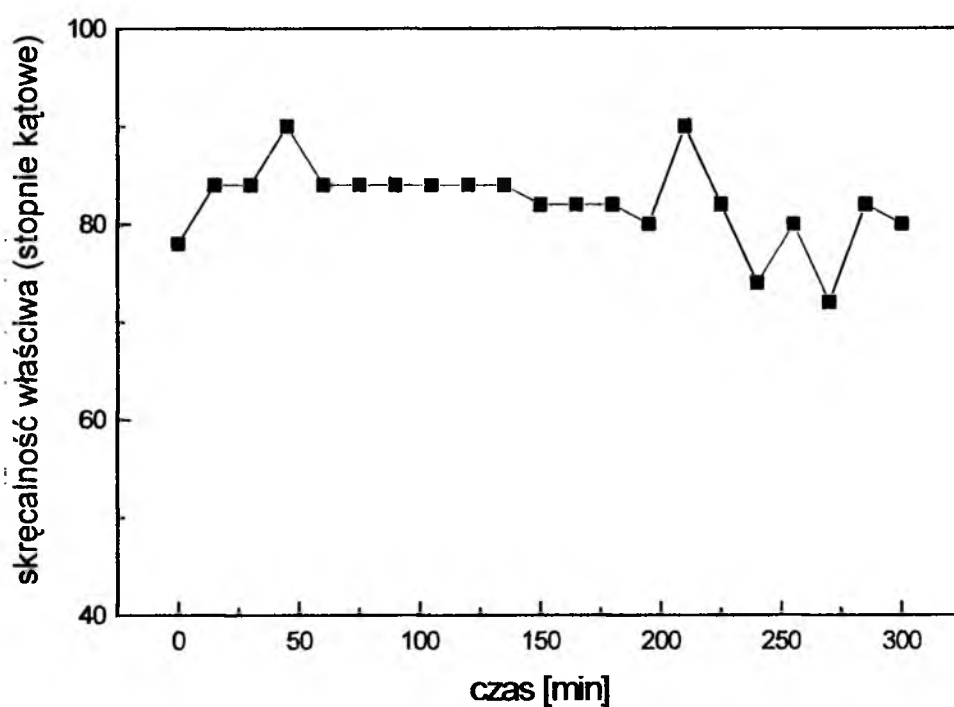
Poniżej przedstawiono wartości skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ dla poszczególnych profenów, pochodzące z literatury.

Tabela 9.4.2.1. Dane literaturowe dotyczące skręcalności właściwej ($[\alpha]_D$) enancjomerów *S* i *R* trzech badanych profenów w temperaturze 25°C

| Profeny | Skręcalność właściwa, $[\alpha]_D$ [kąt skręcania wyrażony w stopniach, °] | |
|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| | <i>S</i> | <i>R</i> |
| Ibuprofen | +53.2 [5] | -57.5 [6] |
| Naproksen | +64.9 [7] +66.3 [8] | -67.2 [8] |
| Kwas 2-fenylopropionowy | 69.2 [9] 79.2 [6] | -80.0 [6] |

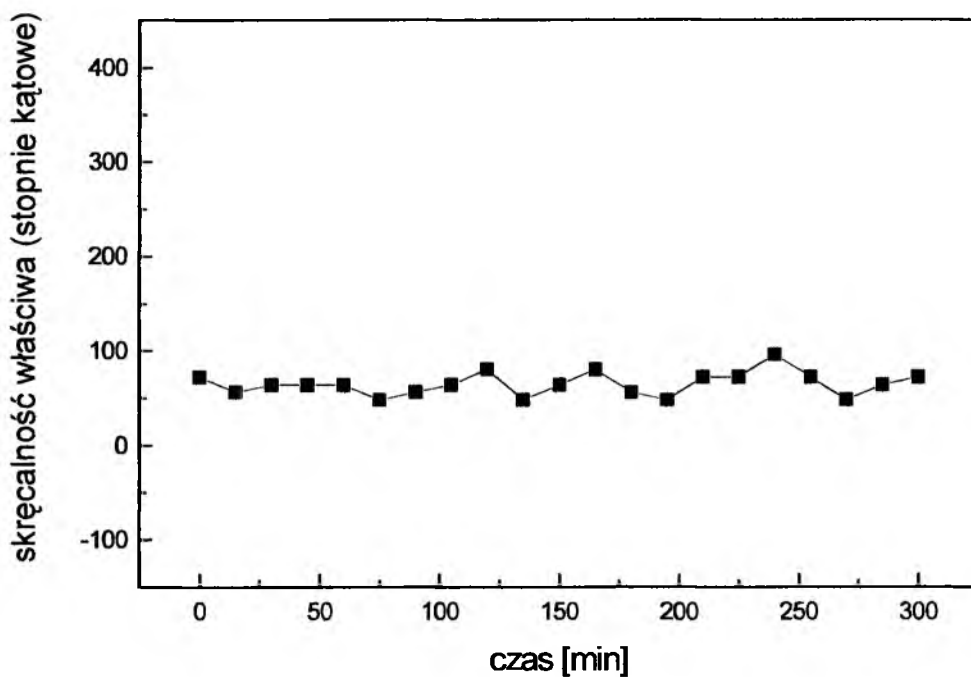


(a)

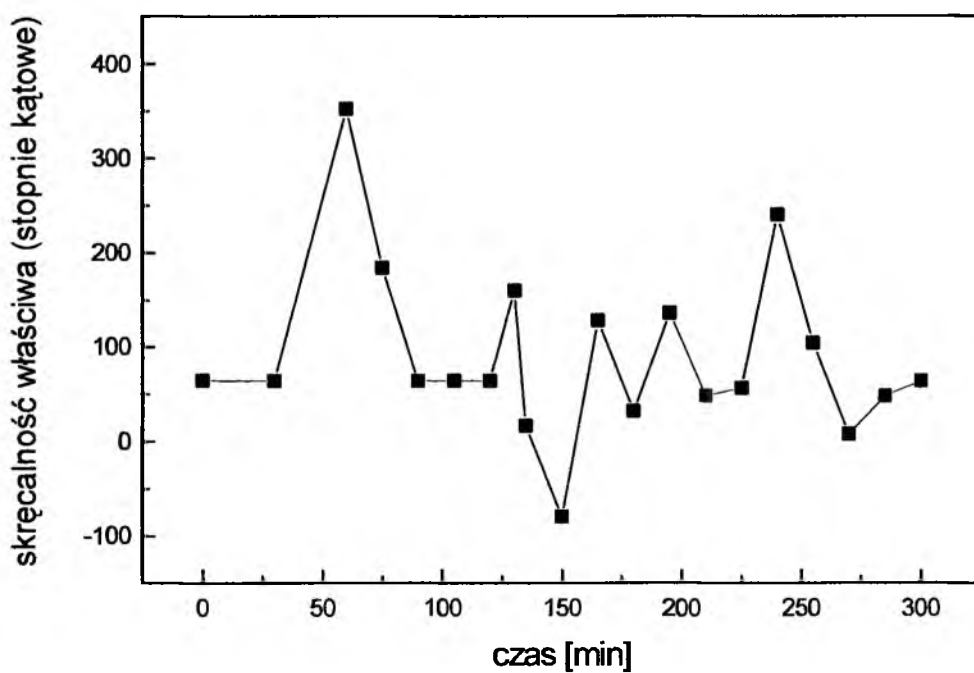


(b)

Rys.9.4.2.7. Zmiany wartości skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ dla *S*-(+)-ibuprofenu w zależności od czasu przechowywania próbki roztworu w 70% roztworze wodnym etanolu w temperaturach (a) $22\pm 2^\circ\text{C}$ i (b) $6\pm 2^\circ\text{C}$

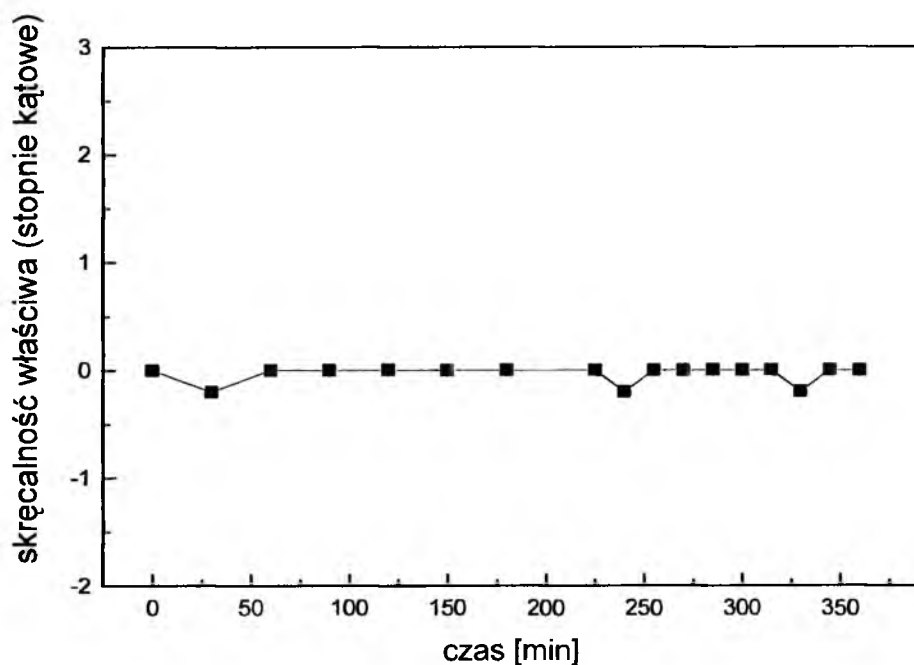


(a)

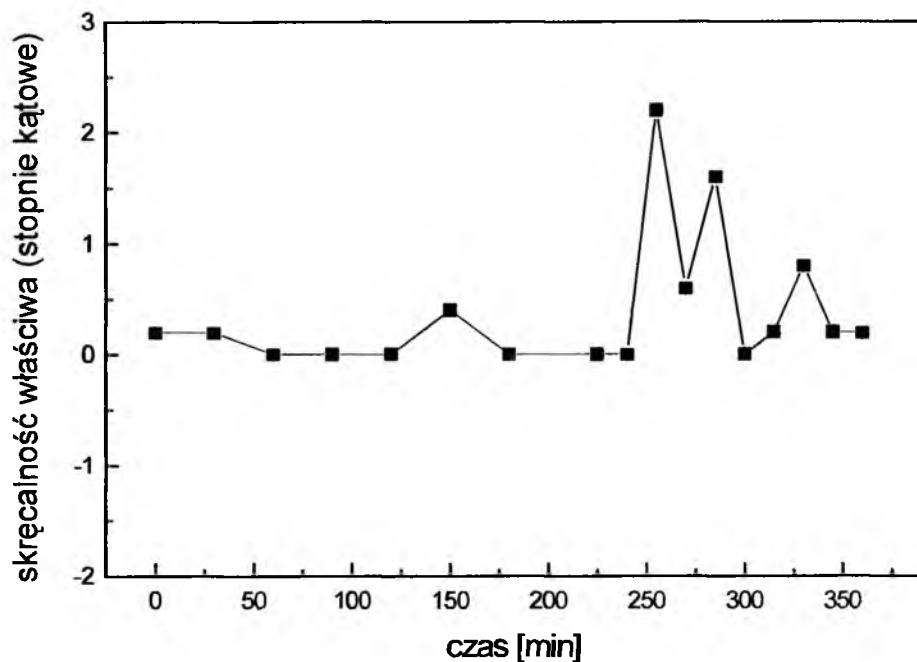


(b)

Rys.9.4.2.8. Zmiany wartości skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ dla *S*-(+)-naproksenu w zależności od czasu przechowywania próbki roztworu w 70% roztworze wodnym etanolu w temperaturach (a) $22\pm 2^\circ\text{C}$ i (b) $6\pm 2^\circ\text{C}$



(a)



(b)

Rys.9.4.2.9. Zmiany wartości skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ dla kwasu *S,R*-(±)-2-fenylpropionowego w zależności od czasu przechowywania próbki roztworu w 70% roztworze wodnym etanolu w temperaturach (a) $22\pm 2^\circ\text{C}$ i (b) $6\pm 2^\circ\text{C}$

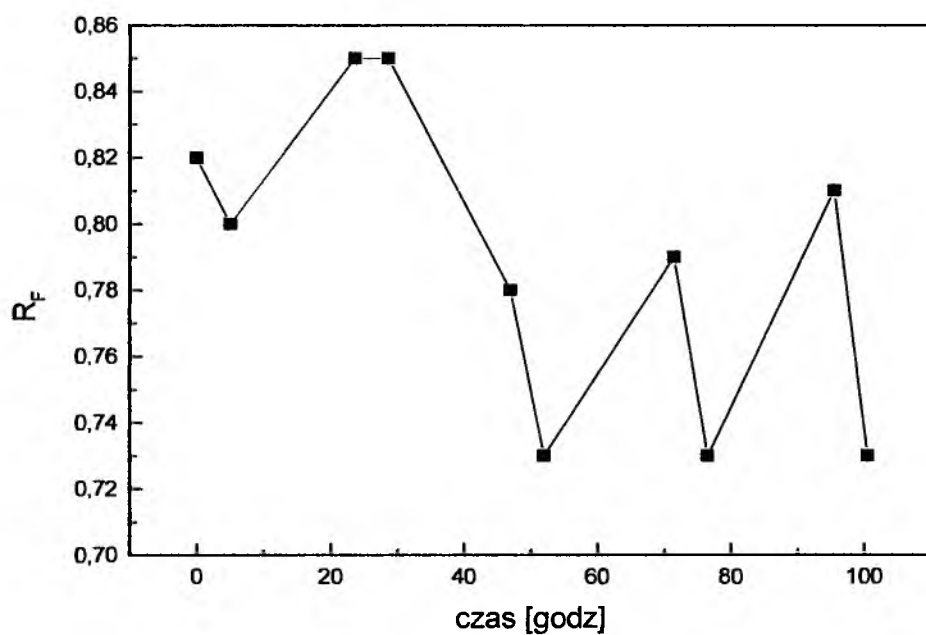
Jak można zauważyć z danych, zamieszczonych na rysunkach 9.4.2.7-9.4.2.9, wyniki przedstawionych badań obejmują znacznie krótszy czas analizy, aniżeli badania prowadzone przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej. Wynika to stąd, że pomiary polarymetryczne trwają znacznie krócej, dzięki czemu, mogą być one prowadzone praktycznie ciągle, lub w niewielkich odstępach czasu, podczas gdy w przypadku naszych badań chromatograficznych minimalny czas jednej analizy wynosił około jednej godziny. Niemniej z rysunków 9.4.2.7-9.4.2.9 wyraźnie wynika, że (i) skręcalność właściwa trzech wybranych profenów zmienia się w sposób oscylacyjny w czasie prowadzenia eksperymentu; (ii) amplituda tych oscylacyjnych zmian jest wyraźnie większa w niższej temperaturze, niż w temperaturze wyższej (analogicznie sytuacja przedstawia się w przypadku wyników otrzymanych przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej). Ponadto oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ były obserwowane nie tylko w przypadku optycznie czystych enancjomerów, tj. *S*-(+)-ibuprofenu i *S*-(+)-naproksenu, ale także w przypadku mieszaniny racemicznej, którą jest kwas *S,R*-(±)-2-fenylopropionowy. Jednakże obserwowana amplituda zmiany skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ jest znacznie większa w przypadku optycznie czystych enancjomerów, tj. *S*-(+)-ibuprofenu i *S*-(+)-naproksenu, niż w przypadku kwasu *S,R*-(±)-2-fenylopropionowego. Dla *S*-(+)-ibuprofenu zmiana skręcalności właściwej kształtowała się od wartości +70° do +90°, a w przypadku *S*-(+)-naproksenu od wartości -70° do +350°. W tych samych warunkach eksperymentalnych zmiana skręcalności właściwej kwasu *S,R*-(±)-2-fenylopropionowego kształtowała się tylko od wartości 0° do niewiele większej niż 2°.

Reasumując, badania polarymetryczne wydają się dostarczać istotnych, bezpośrednich dowodów świadczących o stałych przejściach jednej z enancjomerycznych struktur trzech badanych profenów w drugą, będącą jej lustrzanym odbiciem.

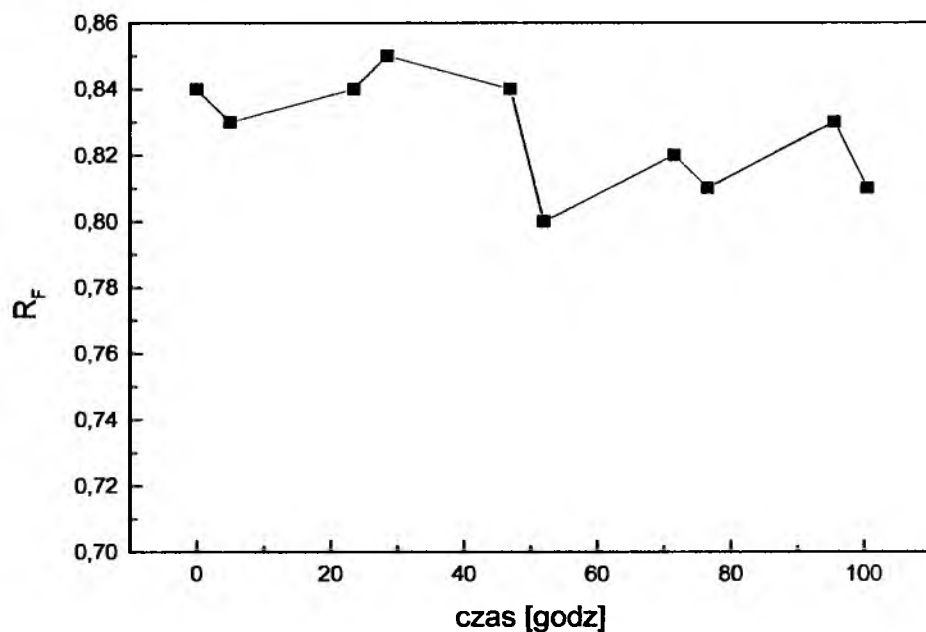
9.4.3. Oscylacyjne zmiany wartości współczynnika opóźnienia (R_F) oraz skręcalności właściwej ($[\alpha]_D$) wybranych profenów podczas ich przechowywania w roztworze dichlorometanu

W podrozdziale 9.4.2. przedstawiono oscylacyjne zmiany współczynnika opóźnienia R_F oraz oscylacyjne zmiany wartości skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ trzech badanych profenów przechowywanych w 70% roztworze wodnym etanolu w funkcji czasu. W celu zbadania, czy oscylacyjna transenancjomeryzacja profenów zachodzi wyłącznie w środowisku wodnym, te same trzy profeny (tj. *S*-(+)-ibuprofen, *S*-(+)-naproksen i kwas *S,R*-(±)-2-fenylopropionowy) były również przechowywane przez okres kilkudziesięciu godzin w rozpuszczalniku niewodnym, jakim był dichlorometan [10]. Dichlorometan jako rozpuszczalnik organiczny zapewnia bowiem mniej korzystne warunki do tego, aby w przypadku rozpatrywanych przez nas profenów wystąpiło w ich cząsteczce przeniesienie protonu, konieczne do zajścia transenancjomeryzacji. Zatem wydaje się w pełni uzasadnione przypuszczenie, że takie warunki eksperymentalne utrudniają wystąpienie oscylacyjnej transenancjomeryzacji profenów.

Poniżej przedstawiono wyniki dotyczące zmiany współczynników opóźnienia R_F w zależności od czasu przechowywania roztworów dla *S*-(+)-ibuprofenu, *S*-(+)-naproksenu i kwasu *S,R*-(±)-2-fenylopropionowego.

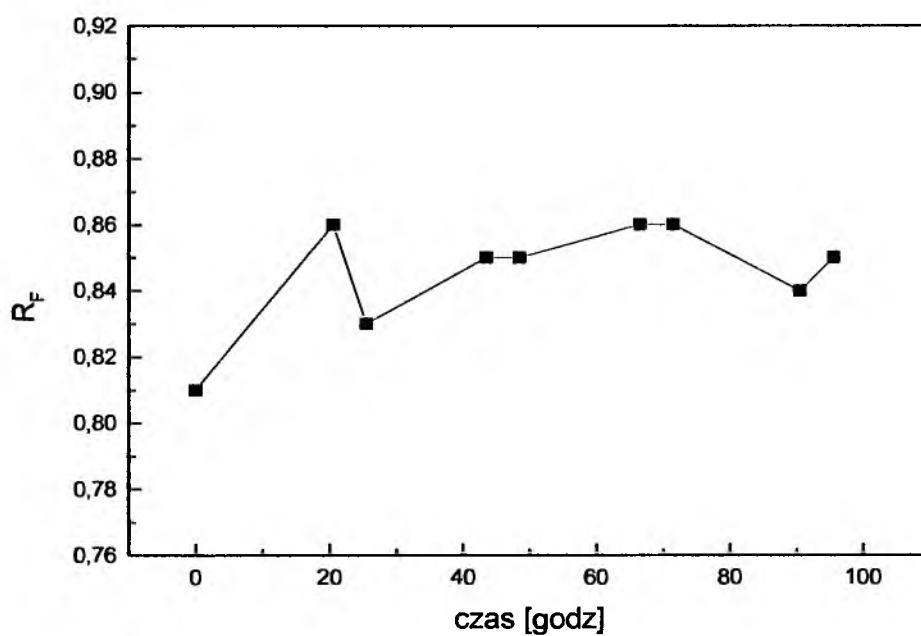


(a)

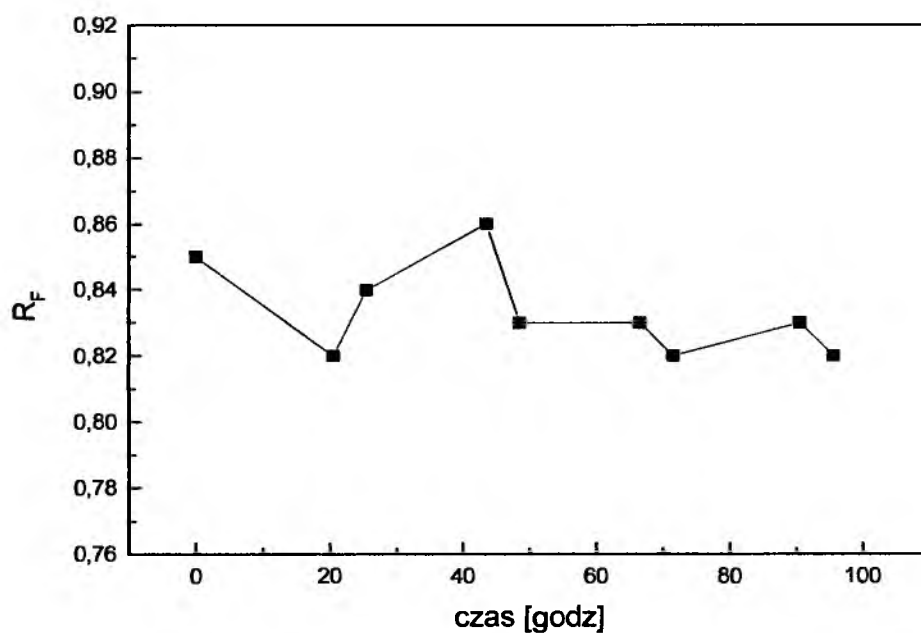


(b)

Rys.9.4.3.1. Zmiany wartości współczynnika opóźnienia R_F dla *S*-(+)-ibuprofenu w zależności od czasu przechowywania próbki roztworu w dichlorometanie w temperaturach (a) $22\pm 2^\circ\text{C}$ i (b) $6\pm 2^\circ\text{C}$

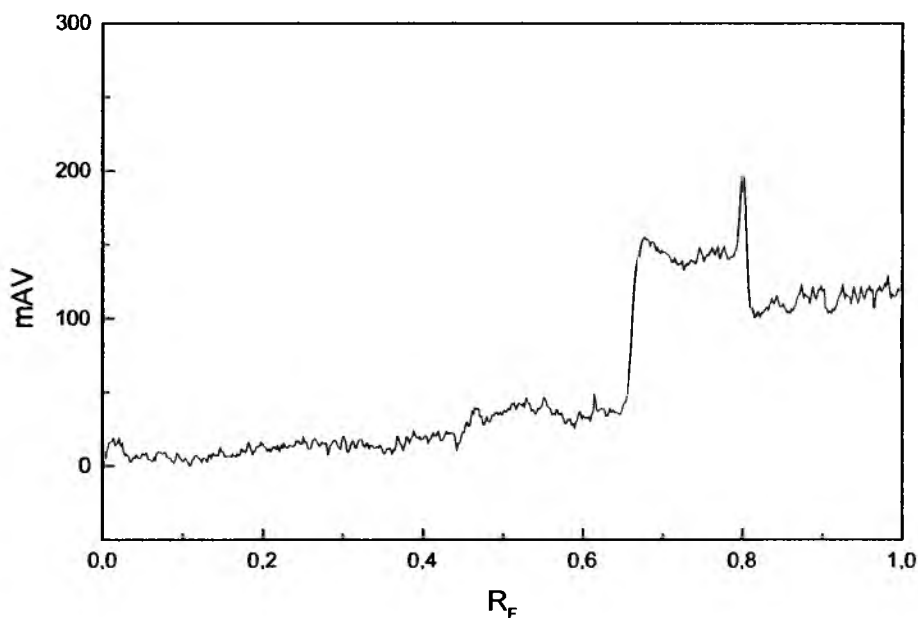


(a)



(b)

Rys.9.4.3.2. Zmiany wartości współczynnika opóźnienia R_F dla *S*-(+)-naproksenu w zależności od czasu przechowywania próbki roztworu w dichlorometanie w temperaturach (a) $22\pm 2^\circ\text{C}$ i (b) $6\pm 2^\circ\text{C}$



Rys.9.4.3.3. Densytogram przedstawiający przykładowy profil stężeniowy racemicznej próbki kwasu *S,R*-(±)-2-fenylpropionowego, zarejestrowany w temperaturze $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Takie kształty profilu stężeniowego są charakterystyczne dla próbek roztworu przechowywanych w temperaturze 22 i 6°C

Na rysunkach 9.4.3.1 i 9.4.3.2 zostało przedstawione zjawisko oscylacyjnych zmian współczynnika opóźnienia R_F dla *S*-(+)-ibuprofenu i *S*-(+)-naproksenu w funkcji czasu, występujące w dwóch różnych temperaturach. Analizując przedstawione wyniki należy podkreślić, że obserwowane oscylacje nie wynikają z błędu zastosowanej techniki, czyli chromatografii cienkowarstwowej, gdyż błąd tej metody nie przekracza ± 0.02 wartości współczynnika opóźnienia R_F , a otrzymane przez nas wyniki wykraczają poza ten przedział wartości. Porównując wyniki otrzymane dla poszczególnych profenów można jednak stwierdzić, że oscylacje występujące podczas przechowywania badanych związków w dichlorometanie są mniejsze, aniżeli te obserwowane podczas przechowywania profenów w 70% roztworze etanolowo-wodnym [3].

Przykładowo roztwór *S*-(+)-ibuprofenu w dichlorometanie przechowywany przez okres pięciu dni w temperaturze $6^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ charakteryzuje się maksymalną zmianą wartości współczynników opóźnienia (ΔR_F) wynoszącą $0.05 R_F$, natomiast dla roztworu *S*-(+)-ibuprofenu w dichlorometanie przechowywanego przez okres pięciu dni w temperaturze $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ maksymalna zmiana wartości współczynników opóźnienia (ΔR_F) wyniosła $0.12 R_F$.

W przypadku roztworu *S*-(+)-naproksenu w dichlorometanie przechowywanego przez okres pięciu dni w temperaturze $6^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ maksymalna zmiana wartości współczynników

opóźnienia (ΔR_F) wyniosła 0.04 R_F , a dla roztworu *S*-(+)-naproksenu w dichlorometanie przechowywanego przez okres pięciu dni w temperaturze $6^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ maksymalna zmiana wartości współczynników opóźnienia (ΔR_F) wyniosła 0.05 R_F .

Nieco inaczej sytuacja przedstawia się w przypadku kwasu *S,R*-(\pm)-2-fenylopropionowego (rys.9.4.3.3). Wyznaczenie wartości współczynników opóźnienia R_F dla tego kwasu przechowywanego w dichlorometanie było praktycznie niemożliwe, ponieważ prawie w każdym przypadku profil stężeniowy pojawiał się w postaci niemal prostokątnego i stosunkowo szerokiego pasma, wyraźnie przedstawiając jednoczesną obecność dwóch antypodów. Chociaż nie udało się w tych warunkach rozdzielić kwasu 2-fenylopropionowego na dwa antypody, to jednak oscylacyjne zmiany profilu stężeniowego były i w tym przypadku wyraźnie dostrzegalne.

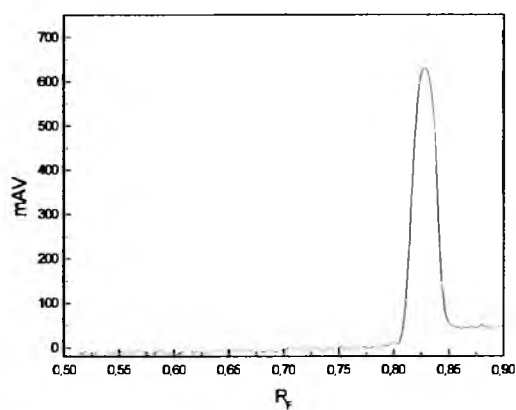
Porównując zmiany wartości współczynników opóźnienia R_F trzech badanych profenów należy podkreślić, że są one większe w temperaturze wynoszącej $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, aniżeli w temperaturze $6^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.

Otrzymane zależności temperaturowe są odmienne od tych, jakie obserwowaliśmy wcześniej w przypadku roztworów etanolowo-wodnych trzech badanych profenów. W przypadku roztworów etanolowo-wodnych badanych profenów amplituda zmian wartości współczynnika opóźnienia R_F jest wyraźnie większa w temperaturze niższej, natomiast w przypadku roztworów dichlorometanowych amplituda zmian wartości współczynnika opóźnienia R_F jest większa w temperaturze wyższej.

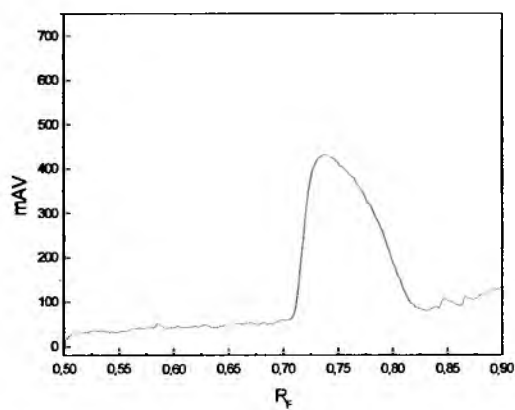
Na rysunkach 9.4.3.4 i 9.4.3.5 przedstawiono celem lepszej ilustracji omawianego zagadnienia zmiany profili stężeniowych, odpowiadające zmianom wartości współczynnika opóźnienia R_F , w postaci serii „stop-klatek”. Na rysunku 9.4.3.4 przedstawiono zmiany profili stężeniowych dla *S*-(+)-ibuprofenu (podobnie kształtują się zmiany profili stężeniowych dla *S*-(+)-naproksenu), natomiast na rysunku 9.4.3.5 przedstawiono zmiany profili stężeniowych dla kwasu *S,R*-(\pm)-2-fenylopropionowego.

Analizując zmiany kształtu profili stężeniowych oraz zmiany pozycji maksimum tych profili, przedstawione na rysunku 9.4.3.4, doszliśmy do przekonania, iż mogą one wynikać z przestrzennej transformacji strukturalnej jednego enancjomeru ibuprofenu w swoje zwierciadlane odbicie, czyli w antymer.

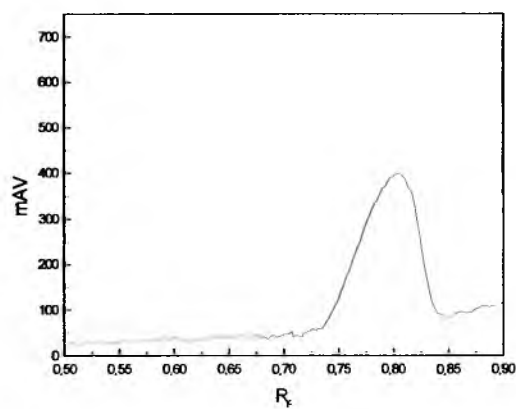
Analizując zmiany kształtu profili stężeniowych oraz zmiany pozycji maksimum tych profili dla kwasu *S,R*-(\pm)-2-fenylopropionowego, przedstawione na rysunku 9.4.3.5 można zauważyć, że nawet w przypadku mieszaniny racemicznej rozpuszczonej w rozpuszczalniku niewodnym oscylacje są wyraźnie widoczne.



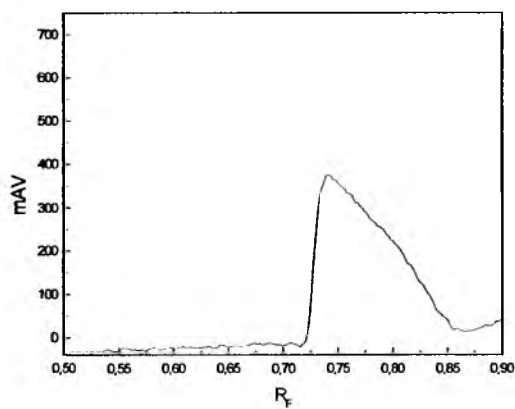
(a)



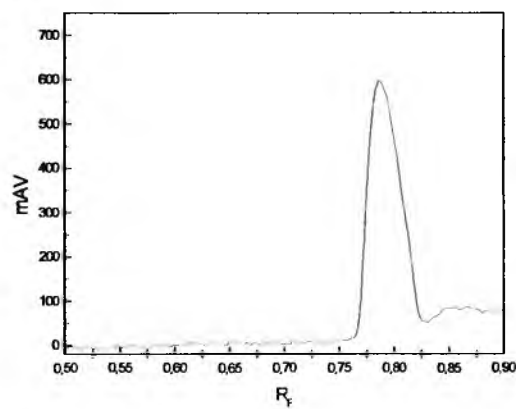
(d)



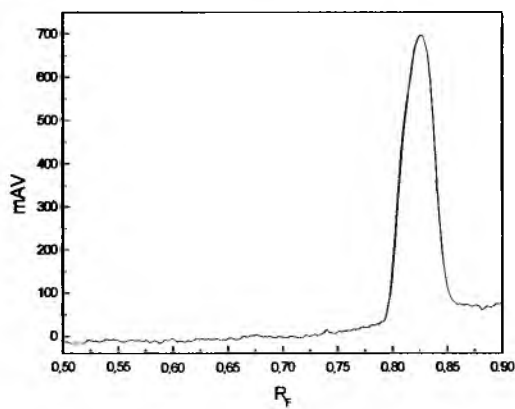
(b)



(e)

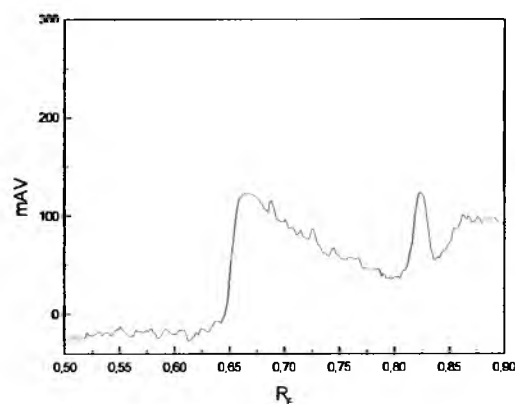


(c)

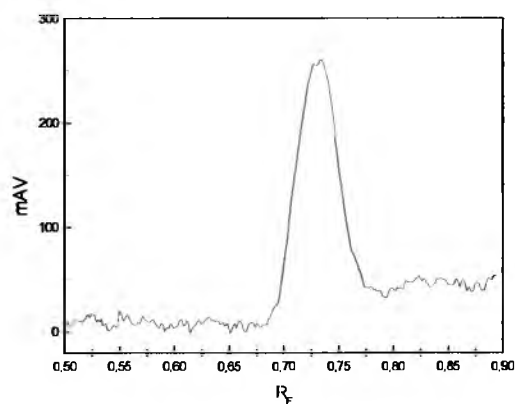


(f)

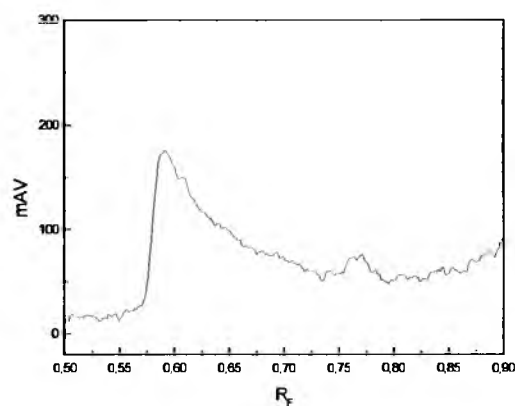
Rys.9.4.3.4. Zmiany profili stężeniowych *S*-(+)-ibuprofenu w czasie jego przechowywania w temperaturze $22 \pm 2^\circ\text{C}$ (a) 0 godzin; (b) 5 godzin; (c) 47 godzin; (d) 52 godziny; (e) 76.5 godziny; (f) 95.5 godziny. Zmiany profili stężeniowych towarzyszą zmianom wartości współczynnika opóźnienia R_F



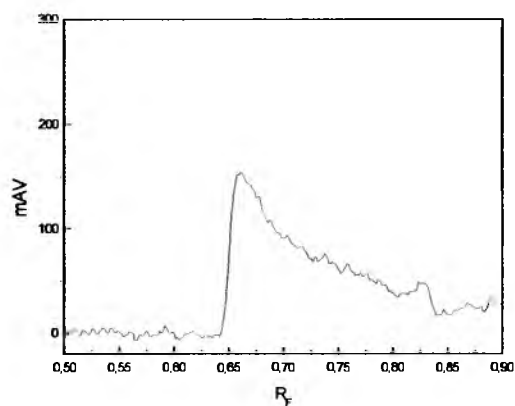
(a)



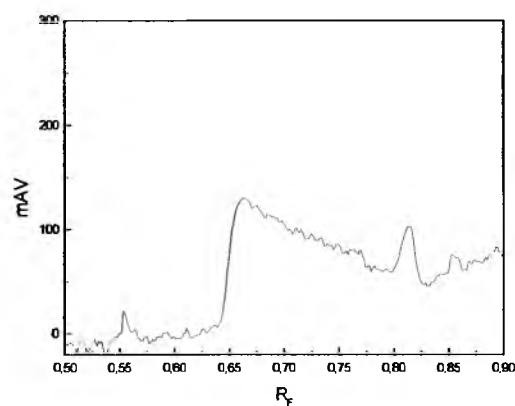
(d)



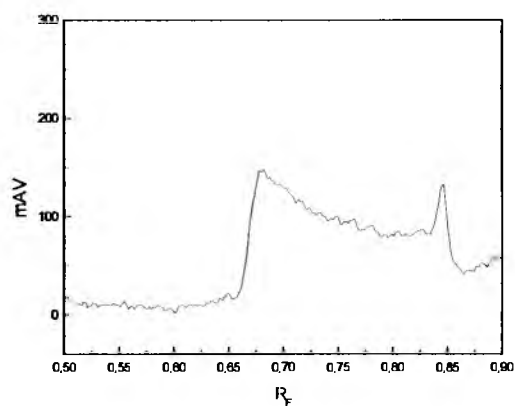
(b)



(e)



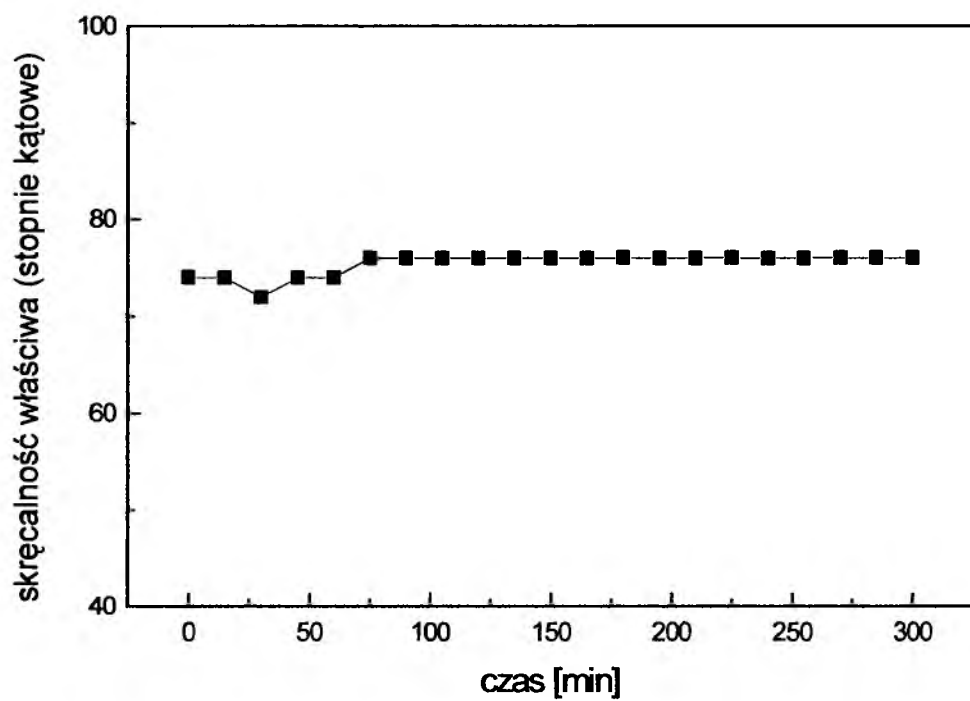
(c)



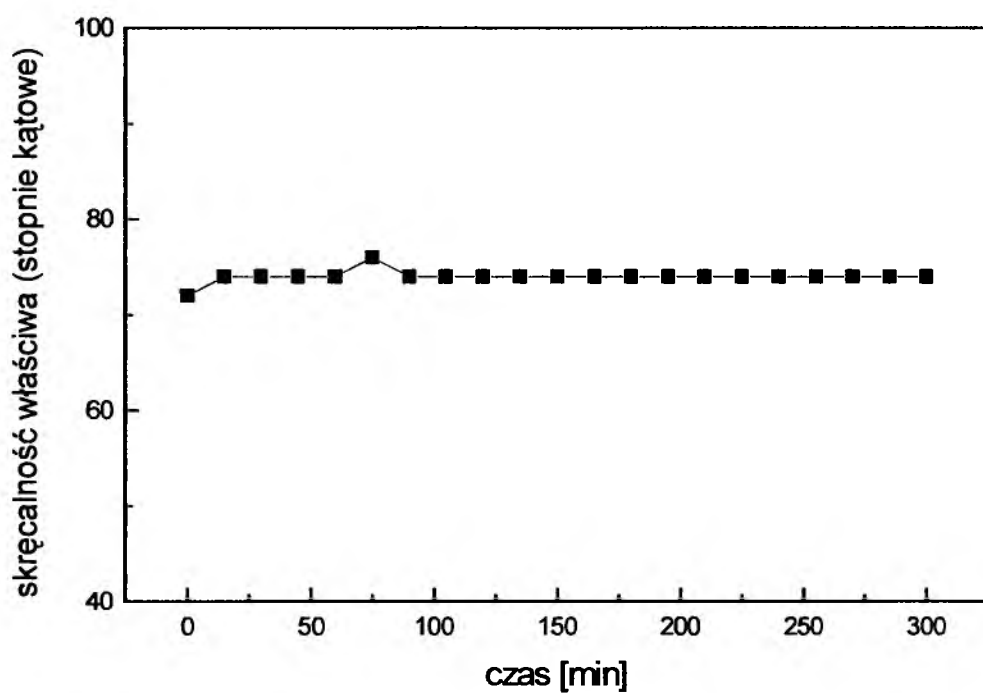
(f)

Rys.9.4.3.5. Zmiany profili stężeniowych kwasu *S,R*(±)-2-fenylpropionowego w czasie jego przechowywania w temperaturze $22 \pm 2^\circ\text{C}$ (a) 0 godzin; (b) 5 godzin; (c) 24 godziny; (d) 47.5 godziny; (e) 72 godziny; (f) 95.5 godziny. Zmiany profili stężeniowych towarzyszą zmianom wartości współczynnika opóźnienia R_F

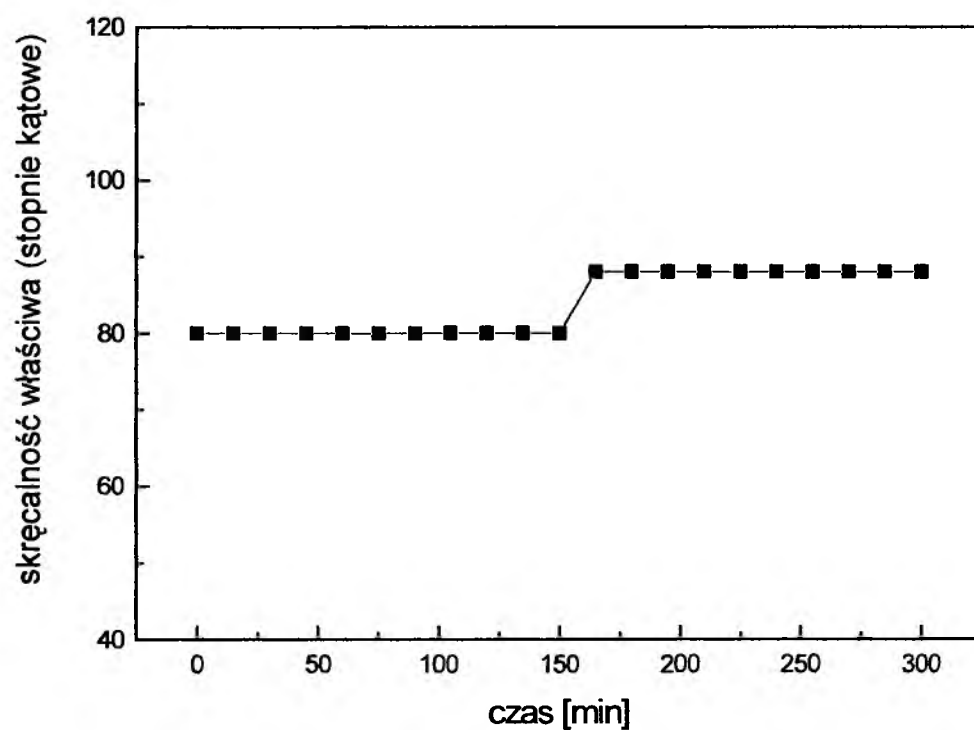
W celu uzyskania doświadczalnego potwierdzenia dotyczącego zaobserwowanego zjawiska przeprowadzono również badania polarymetryczne. Mierzono skręcalność właściwą $[\alpha]_D$ każdego z wybranych profenów w funkcji czasu [10], a wyniki badań przedstawiono na rysunkach 9.4.3.6 i 9.4.3.7.



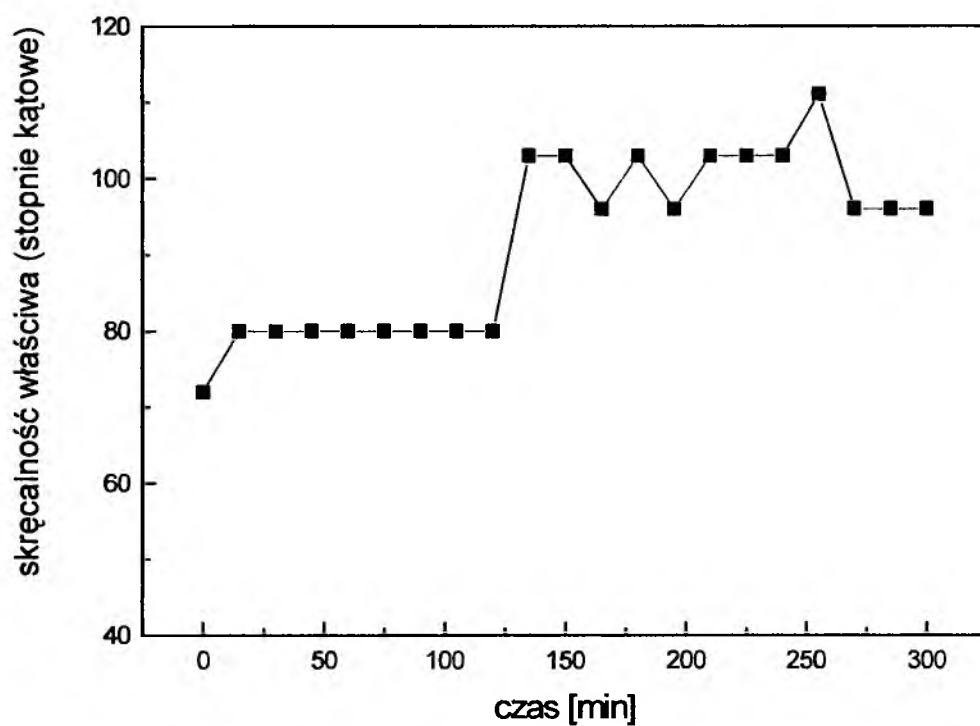
(a)



Rys.9.4.3.6. Zmiany wartości skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ dla *S*-(+)-ibuprofenu w zależności od czasu przechowywania próbki roztworu w dichlorometanie w temperaturach (a) $22\pm 2^\circ\text{C}$ i (b) $6\pm 2^\circ\text{C}$



(a)



(b)

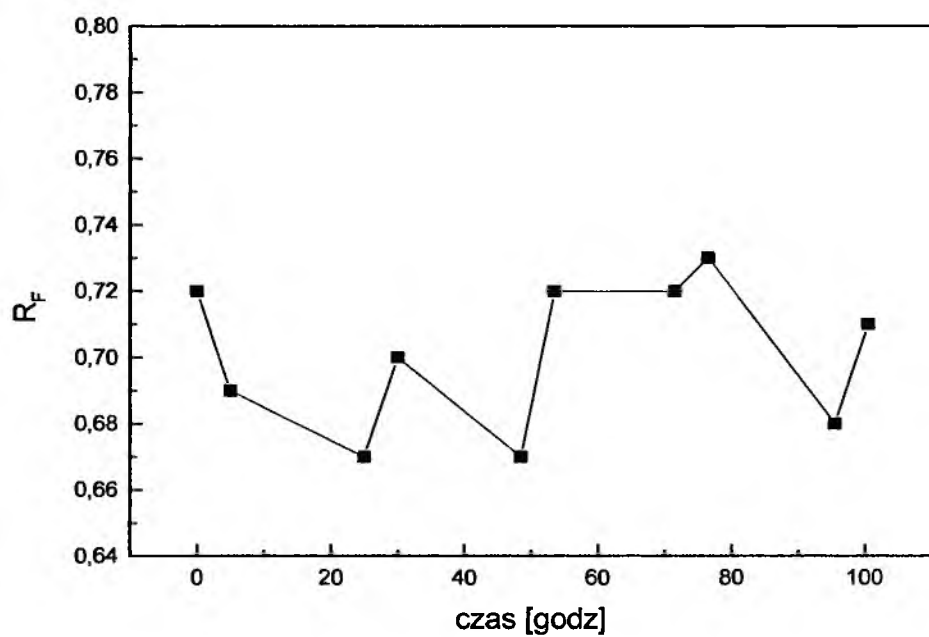
Rys.9.4.3.7. Zmiany wartości skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ dla *S*-(+)-naproksenu w zależności od czasu przechowywania próbki roztworu w dichlorometanie w temperaturach (a) $22\pm 2^\circ\text{C}$ i (b) $6\pm 2^\circ\text{C}$

Jak to już zostało powiedziane wcześniej (podrozdział 9.4.2.), wyniki badań polarymetrycznych obejmują znacznie krótszy okres czasu, aniżeli badania prowadzone przy użyciu chromatografii cienkowsarstwowej. Analizując wyniki przedstawione na rysunkach 9.4.3.6 i 9.4.3.7 widać wyraźnie, że skręcalność właściwa $[\alpha]_D$ dla *S*-(+)-ibuprofenu i *S*-(+)-naproksenu zmienia się, aczkolwiek w niewielkim stopniu, w funkcji czasu (nie zaobserwowano żadnych zmian skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ dla kwasu *S,R*-(±)-2-fenylopropionowego). Otrzymane wyniki polarymetryczne wydają się dostarczać wystarczających dowodów na to, że dichlorometan poważnie utrudnia występowanie zmian konfiguracji badanych profenów, niemniej jednak zmiany takie również i w tym przypadku zachodzą.

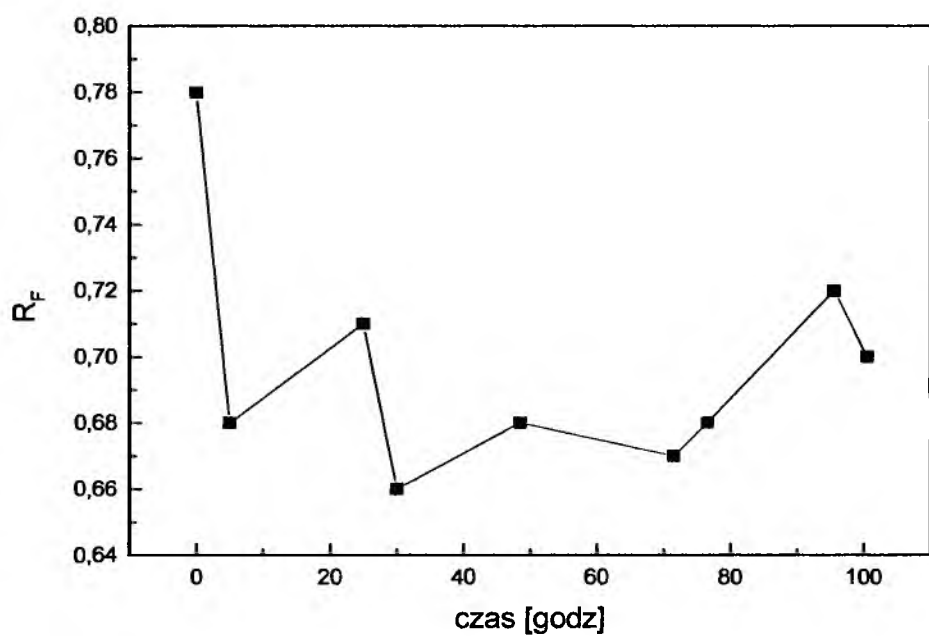
9.4.4. Oscylacyjne zmiany wartości współczynnika opóźnienia (R_F) wybranych profenów podczas ich przechowywania w roztworze soli fizjologicznej

We wcześniejszych podrozdziałach przedstawiono oscylacyjne zmiany współczynnika opóźnienia R_F oraz oscylacyjne zmiany wartości skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ trzech badanych profenów, przechowywanych w 70% roztworze wodnym etanolu i dichlorometanie w zależności od czasu. Kolejnym rozpuszczalnikiem, który został przez nas wytypowany do badań był roztwór soli fizjologicznej. Powszechnie wiadomo, że roztwór soli fizjologicznej jest często podawany pacjentom z dodatkiem leków i może zdarzyć się, że takim lekiem będzie któryś z profenów. Dlatego też postanowiono sprawdzić zachowanie wybranych profenów podczas ich przechowywania w roztworze soli fizjologicznej [11].

Poniżej przedstawiono wyniki dotyczące zmiany współczynników opóźnienia R_F w zależności od czasu przechowywania roztworów *S*-(+)-ibuprofenu i *S*-(+)-naproksenu w soli fizjologicznej.

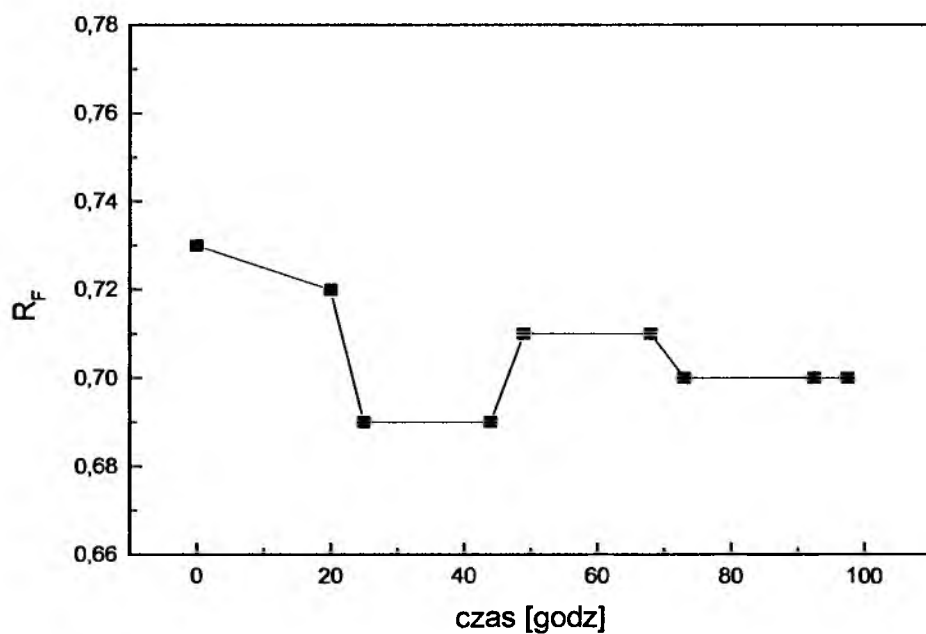


(a)

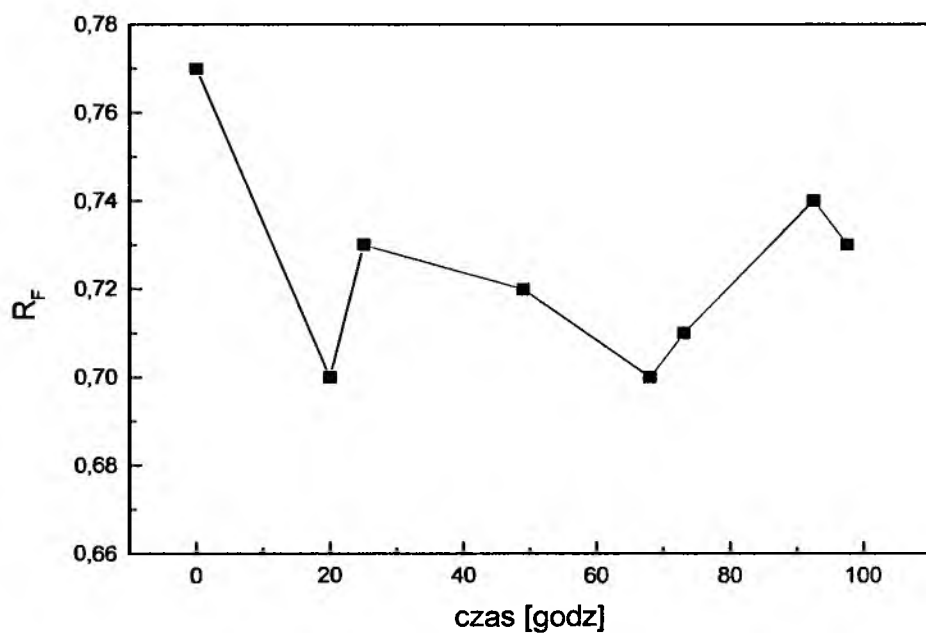


(b)

Rys.9.4.4.1. Zmiany wartości współczynnika opóźnienia R_F dla *S*-(+)-ibuprofenu w zależności od czasu przechowywania próbki roztworu w soli fizjologicznej w temperaturach (a) $22\pm 2^\circ\text{C}$ i (b) $6\pm 2^\circ\text{C}$



(a)



(b)

Rys.9.4.4.2. Zmiany wartości współczynnika opóźnienia R_F dla *S*-(+)-naproksenu w zależności od czasu przechowywania próbki roztworu w soli fizjologicznej w temperaturach (a) $22\pm 2^\circ\text{C}$ i (b) $6\pm 2^\circ\text{C}$

Na rysunkach 9.4.4.1 i 9.4.4.2 zostało przedstawione zjawisko oscylacyjnych zmian współczynnika opóźnienia R_F w czasie, występujące w dwóch różnych temperaturach. Analizując przedstawione wyniki należy podkreślić, że obserwowane oscylacje nie wynikają z błędu zastosowanej techniki, czyli chromatografii cienkowarstwowej, gdyż błąd tej metody nie przekracza ± 0.02 wartości współczynnika opóźnienia R_F , a otrzymane przez nas wyniki wykraczają poza ten właśnie przedział wartości.

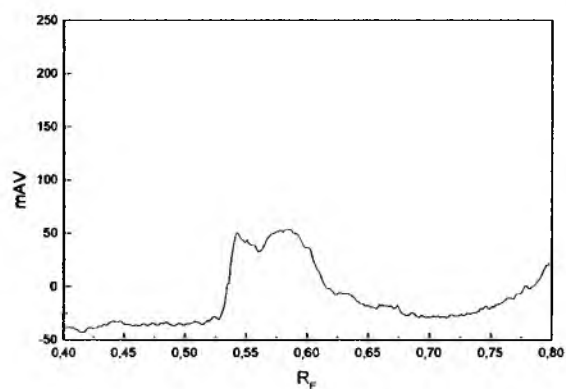
Amplituda zmian wartości współczynnika opóźnienia R_F dla *S*-(+)-ibuprofenu przechowywanego w roztworze soli fizjologicznej i chromatografowanego w temperaturze $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ wyniosła $0.06 R_F$ (w dichlorometanie ta zmiana wynosiła $0.12 R_F$, a w 70% roztworze wodnym etanolu $0.11 R_F$).

Amplituda zmian wartości współczynnika opóźnienia R_F dla *S*-(+)-ibuprofenu przechowywanego w roztworze soli fizjologicznej i chromatografowanego w temperaturze $6^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ wyniosła $0.12 R_F$ (w dichlorometanie ta zmiana wynosiła $0.05 R_F$, a w 70% roztworze wodnym etanolu $0.18 R_F$).

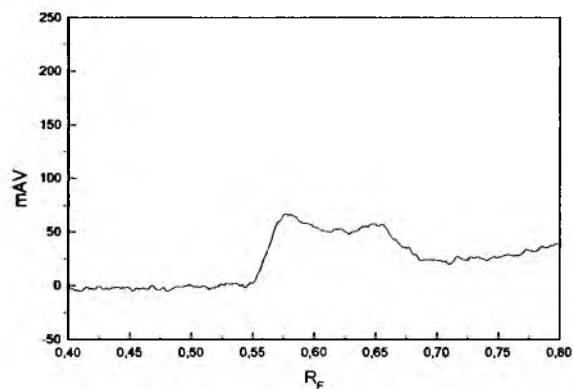
Maksymalna zmiana wartości współczynnika opóźnienia R_F dla *S*-(+)-naproksenu przechowywanego w roztworze soli fizjologicznej i chromatografowanego w temperaturze $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ wyniosła $0.04 R_F$ (w dichlorometanie ta zmiana wynosiła $0.05 R_F$, a w 70% roztworze wodnym etanolu $0.07 R_F$).

Maksymalna zmiana wartości współczynnika opóźnienia R_F dla *S*-(+)-naproksenu przechowywanego w roztworze soli fizjologicznej i chromatografowanego w temperaturze $6^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ wyniosła $0.07 R_F$ (w dichlorometanie ta zmiana wynosiła $0.04 R_F$, a w 70% roztworze wodnym etanolu $0.06 R_F$).

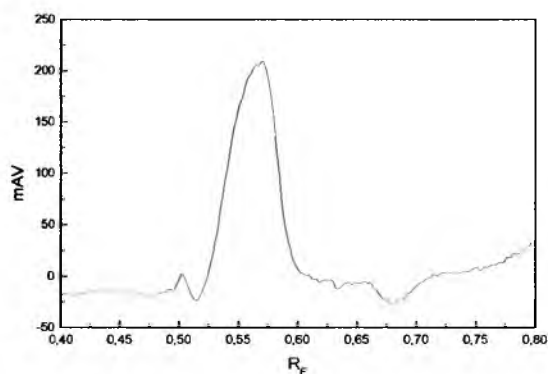
Wyznaczenie wartości współczynników opóźnienia R_F dla kwasu *S,R*-(\pm)-2-fenylopropionowego przechowywanego w roztworze soli fizjologicznej w temperaturze $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ i $6^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ było praktycznie niemożliwe, ponieważ w każdym przypadku chromatograficzny profil pojawiał się w postaci źle wykształconego i bardzo szerokiego pasma (rys.9.4.4.3).



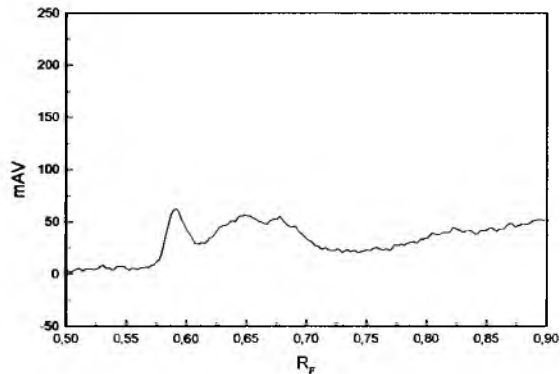
(a)



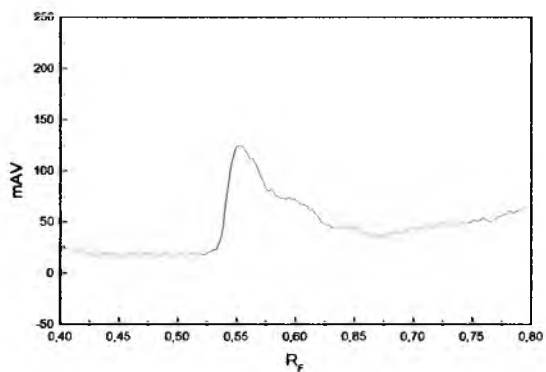
(d)



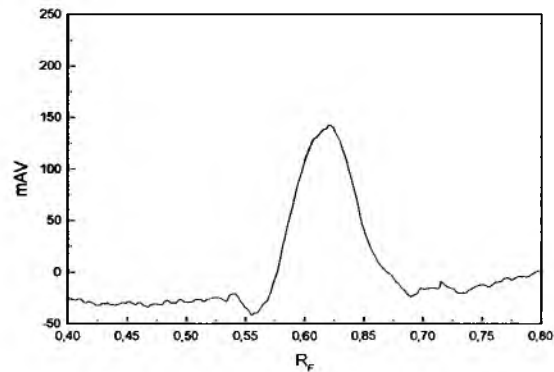
(b)



(e)

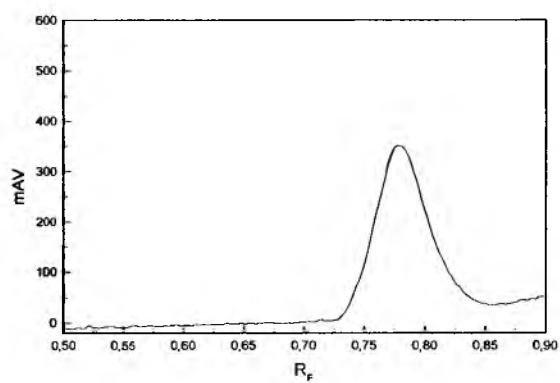


(c)

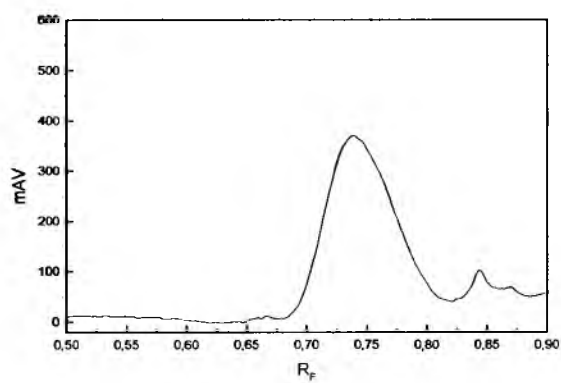


(f)

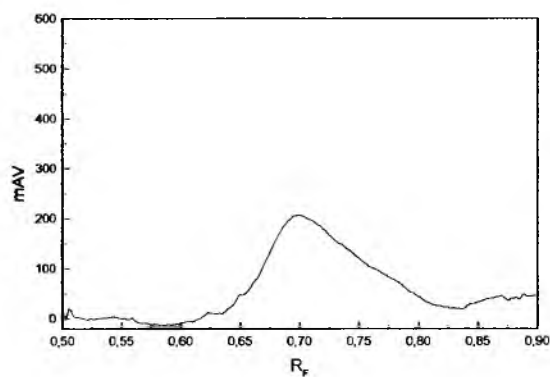
Rys.9.4.4.3. Zmiany profili stężeniowych kwasu 2-fenylopropionowego w czasie jego przechowywania w temperaturze $22 \pm 2^\circ\text{C}$ (a) 25 godzin; (b) 43.5 godziny; (c) 72 godziny; (d) 91 godzin; (e) 96 godzin; (f) 164.5 godziny. Zmiany profili stężeniowych towarzyszą zmianom wartości współczynnika opóźnienia R_F



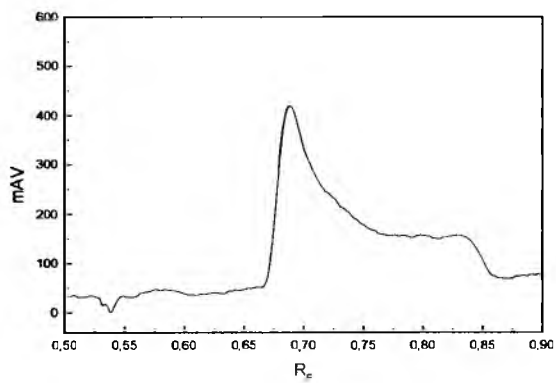
(a)



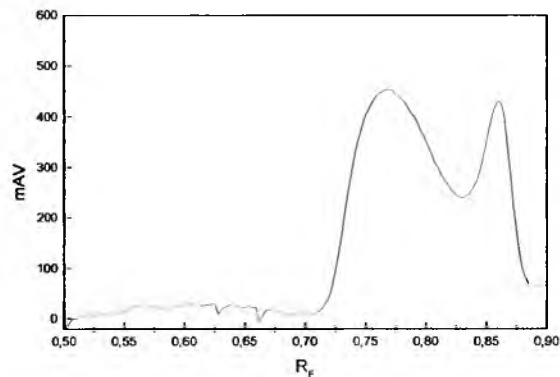
(d)



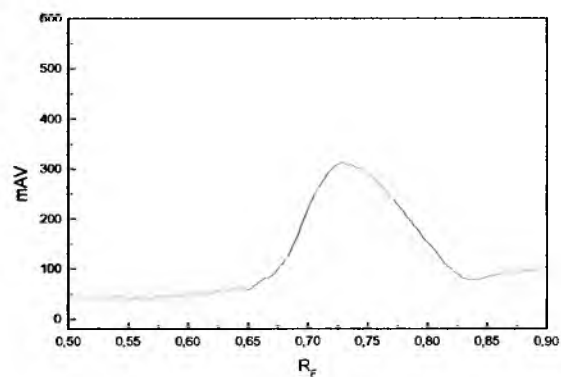
(b)



(e)



(c)



(f)

Rys.9.4.4.4. Zmiany profili stężeniowych *S*-(+)-naproksenu w czasie jego przechowywania w temperaturze $22 \pm 2^\circ\text{C}$ (a) 0 godzin; (b) 20 godzin; (c) 44 godziny; (d) 68 godzin; (e) 73 godziny; (f) 97.5 godziny. Zmiany profili stężeniowych towarzyszą zmianom wartości współczynnika opóźnienia R_F

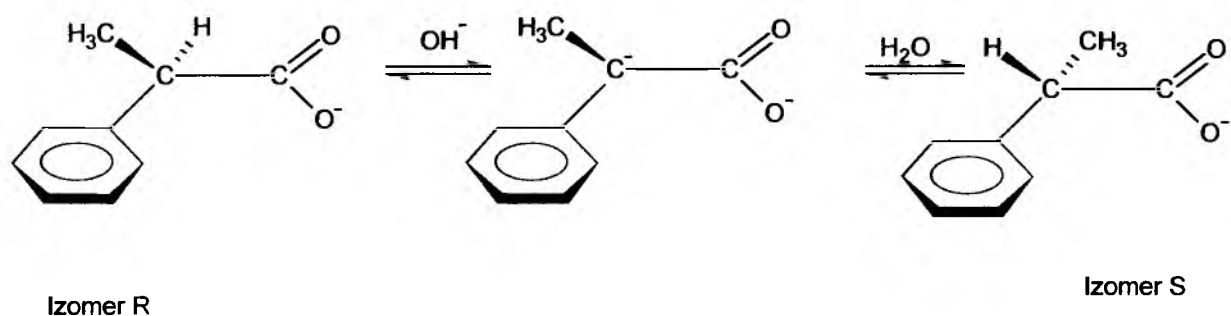
Na rysunkach 9.4.4.3 i 9.4.4.4 przedstawiono zmiany profili stężeniowych kwasu *S,R*-(±)-2-fenylopropionowego i *S*-(±)-naproksenu w roztworze soli fizjologicznej odpowiadające zmianom wartości współczynnika opóźnienia R_F w czasie, w postaci serii „stop-klatek”. Analizując zmiany kształtu profili stężeniowych oraz zmiany pozycji maksimum tych profili, przedstawione na rysunkach 9.4.4.3 i 9.4.4.4, wysnuto wniosek, iż mogą one wynikać z przestrzennej transformacji strukturalnej jednego enancjomeru w swoje zwierciadlane odbicie, czyli w antymer, co sugerują również wcześniejsze obserwacje dotyczące roztworów etanolowo-wodnych [3] i dichlorometanowych [10] profenów. Ponadto seria „stop klatek” przedstawiona na rysunku 9.4.4.4 jest charakterystyczna dla dwóch profenów badanych w postaci pojedynczego enancjomeru, tj. dla *S*-(+)-naproksenu i dla *S*-(+)-ibuprofenu i zgadza się z poszczególnymi oscylacyjnymi zmianami wartości współczynnika opóźnienia R_F .

W tej części przeprowadzonego eksperymentu nie można było zastosować polarymetrii do oceny oscylacyjnej transenancjomeryzacji badanych profenów z powodu ich niewielkiej rozpuszczalności w roztworze soli fizjologicznej. Na podstawie wyników wcześniej przeprowadzonych badań wydaje się jednak, że chromatografia cienkowarstwowa umożliwia śledzenie transenancjomeryzacji profenów w sposób niezależny.

Wyniki przedstawione w trzech podrozdziałach 9.4.2. - 9.4.4. w pełni potwierdzają zdolność badanych profenów do ulegania oscylacyjnej transenancjomeryzacji zarówno w środowisku wodnym, jak i niewodnym. Podstawowa różnica między tymi wynikami polega na amplitudzie obserwowanych oscylacji, co jest bezpośrednio związane z rodzajem zastosowanego rozpuszczalnika (a także z temperaturą przechowywania badanych roztworów).

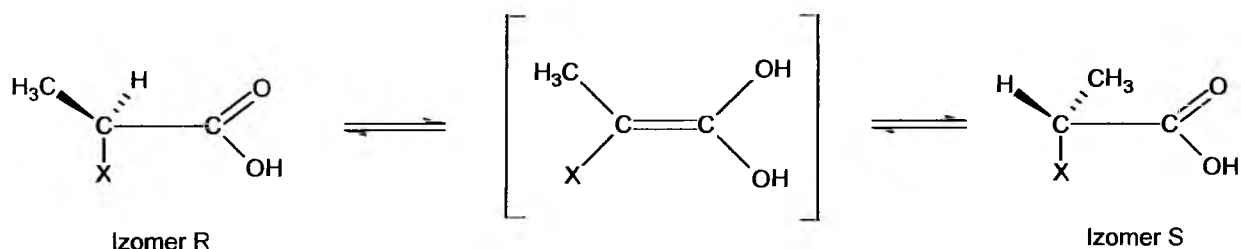
9.4.5. Propozycje molekularnego mechanizmu transenancjomeryzacji profenów

We wcześniejszych podrozdziałach przedstawiono zmiany wartości współczynnika opóźnienia R_F i skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ trzech wybranych profenów w zależności od czasu przechowywania próbki. Naszym kolejnym krokiem badawczym było zastanowienie się nad molekularnym mechanizmem wyżej wspomnianego zjawiska. Dokonując przeglądu literaturowego napotkaliśmy artykuł przedstawiający mechanizm transenancjomeryzacji anionu kwasu karboksylowego [12]. Mechanizm ten jest oparty na tworzeniu anionu enolanowego. Jeżeli atom węgla w karboanionie obdarzony ładunkiem ujemnym znajduje się w bezpośrednim sąsiedztwie wiązania π wiążącego atom węgla z tlenem, to taki karboanion ma płaską konfigurację i może być trwały, a także traci swoją chiralność. Zatem w wyniku powtórnego przekształcenia anionu enolanowego w zwykły anion kwasu karboksylowego może nastąpić zjawisko transenancjomeryzacji (rys.9.4.5.1).

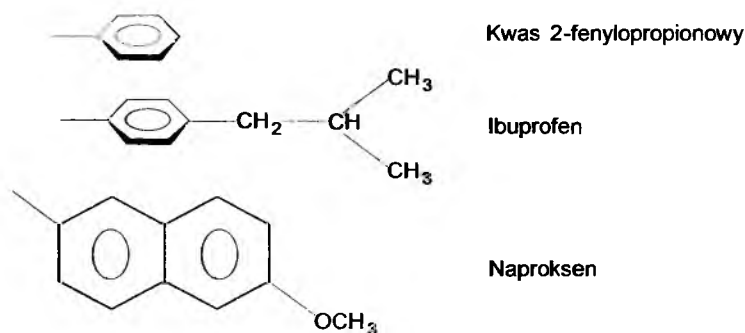


Rys.9.4.5.1. Molekularny mechanizm transenancjomeryzacji na przykładzie soli chiralnej molekuly, na podstawie danych literaturowych [12]

Alternatywnym mechanizmem, odpowiedzialnym za transenancjomeryzację badanych przez nas profenów może być mechanizm oparty na racemizacji ibuprofenu na drodze tautomerizacji keto-enolowej (rys.9.4.5.2), katalizowanej zasadą [13].

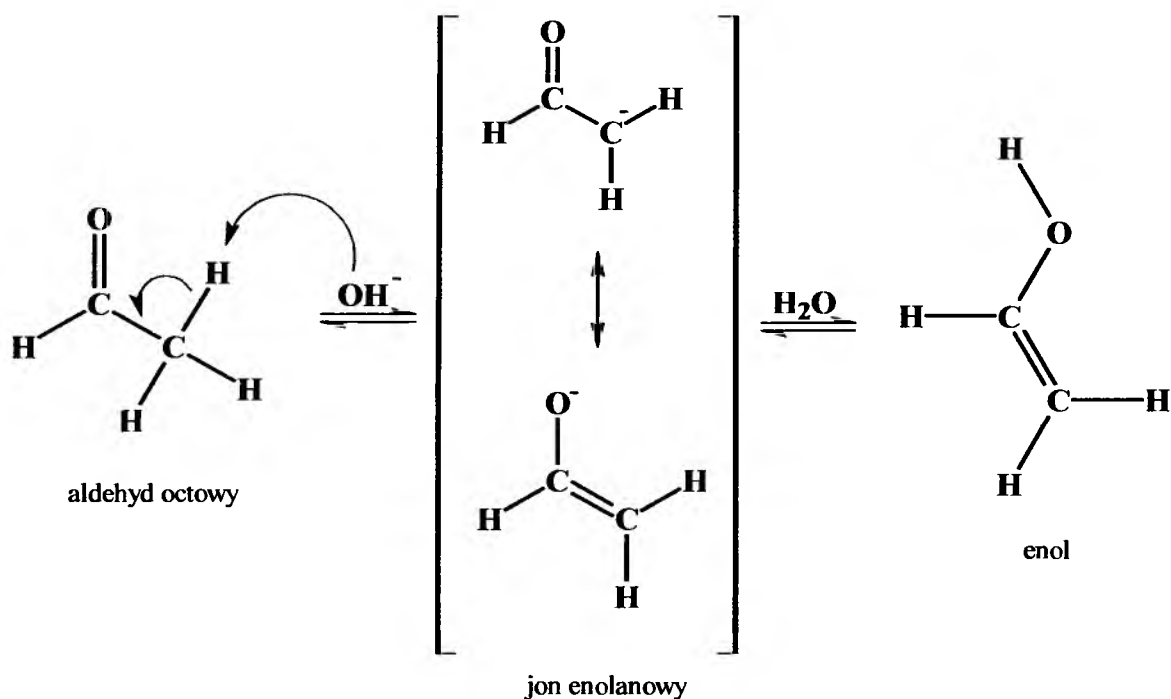


X:

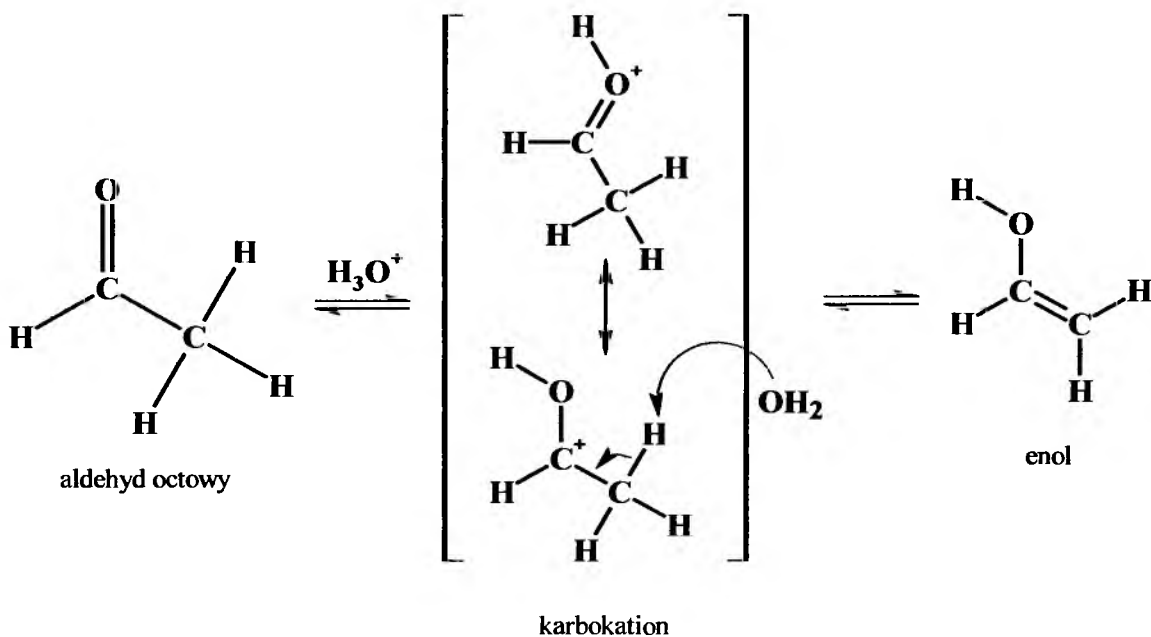


Rys.9.4.5.2. Molekularny mechanizm transenancjomeryzacji na drodze tautomerii keto-enolowej na przykładzie chiralnych molekuł trzech wybranych kwasów 2-arylopropionowych, na podstawie danych literaturowych [13]

Zgodnie z obecnym stanem wiedzy wiadomo także, że tautomerizacja keto-enolowa może przebiegać równie efektywnie, gdy katalizatorem jest kwas [14]. Na rysunkach 9.4.5.3 i 9.4.5.4 przykładowo przedstawiono mechanizm katalizowanej zasadą i kwasem reakcji tworzenia enolu, przy czym związkiem wyjściowym jest tu aldehyd octowy.



Rys.9.4.5.3. Mechanizm katalizowanej zasadą reakcji tworzenia enolu z aldehydu octowego [14]



Rys.9.4.5.4. Mechanizm katalizowanej kwasem reakcji tworzenia enolu z aldehydu octowego [14]

W celu potwierdzenia naszego wcześniejszego założenia dotyczącego transeńcjomeryzacji badanych profenów w środowisku wodnym postanowiliśmy zastąpić rozpuszczalniki wodne [3,11] mniej polarnym rozpuszczalnikiem organicznym; dichlorometanem [10]. Najwyraźniej zmiana rozpuszczalnika na mniej polarny sprawia, że w nowych warunkach badane przez nas profeny ulegają dysocjacji elektrolitycznej w znacznie

mniej stopniu aniżeli w środowisku wodnym. Nie zmienia to jednak faktu, że nawet w środowisku niewodnym może dochodzić do dysocjacji elektrolitycznej, co z kolei pozwala nam przypuszczać, że w obu przypadkach (rozpuszczalnik wodny i niewodny) mamy do czynienia z podobnym mechanizmem reakcji.

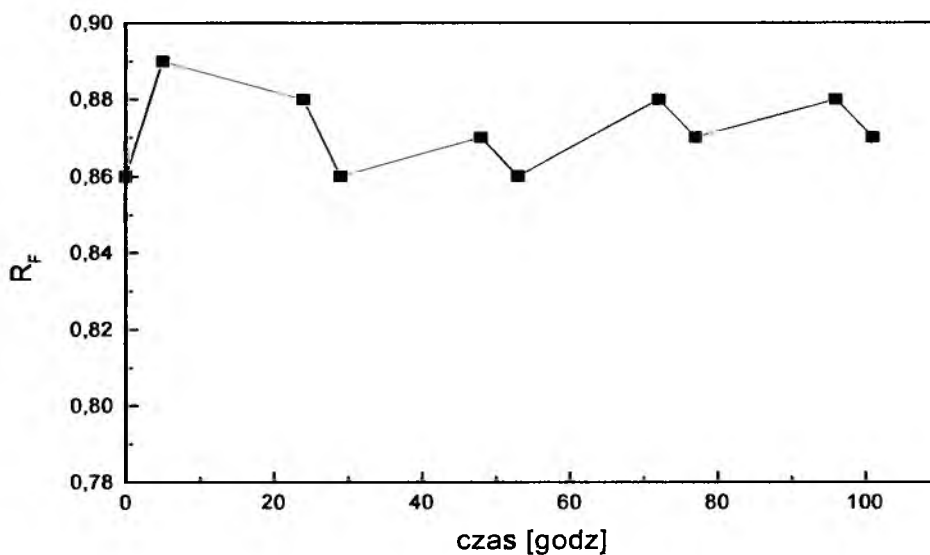
Na podstawie przedstawionych w tym podrozdziale teoretycznych rozważań nad mechanizmem transenancjomeryzacji profenów nie można jednoznacznie stwierdzić, czy to samorzutne zjawisko jest wynikiem reakcji katalizowanej kwasem (byłaby to samokataliza przy pomocy protonów pochodzących od częściowo zdysocjowanych elektrolitycznie molekuł poszczególnych profenów), czy też zasadą (wodę można uznać za rozpuszczalnik amfiprotyczny). Dlatego też w podrozdziale 9.4.6. zostaną przedstawione wyniki stosownych badań, mających na celu udzielenie odpowiedzi na postawione wcześniej pytanie co do mechanizmu transenancjomeryzacji profenów.

9.4.6. Badanie mechanizmu transenancjomeryzacji profenów techniką chromatografii cienkowarstwowej na przykładzie *S*-(+)-naproksenu

Jak już zostało wspomniane w podrozdziale 9.4.5., tautomeryzacja keto-enolowa może być katalizowana kwasem lub zasadą. Wiadomo także, że tworzenie anionu enolanowego jest katalizowane wyłącznie zasadą. W celu ustalenia, z jakim rodzajem katalizy możemy mieć w przypadku transenancjomeryzacji profenów do czynienia, przeprowadziliśmy stosowne badania. W tej części badań testowym analitem był *S*-(+)-naproksen przechowywany przez dłuższy okres czasu (kilku godzin lub kilku dni) w dwóch różnych rozpuszczalnikach. Dwa różne rozpuszczalniki *S*-(+)-naproksenu dobraliśmy w taki sposób, aby jeden roztwór miał odczyn kwaśny, a drugi zasadowy [11].

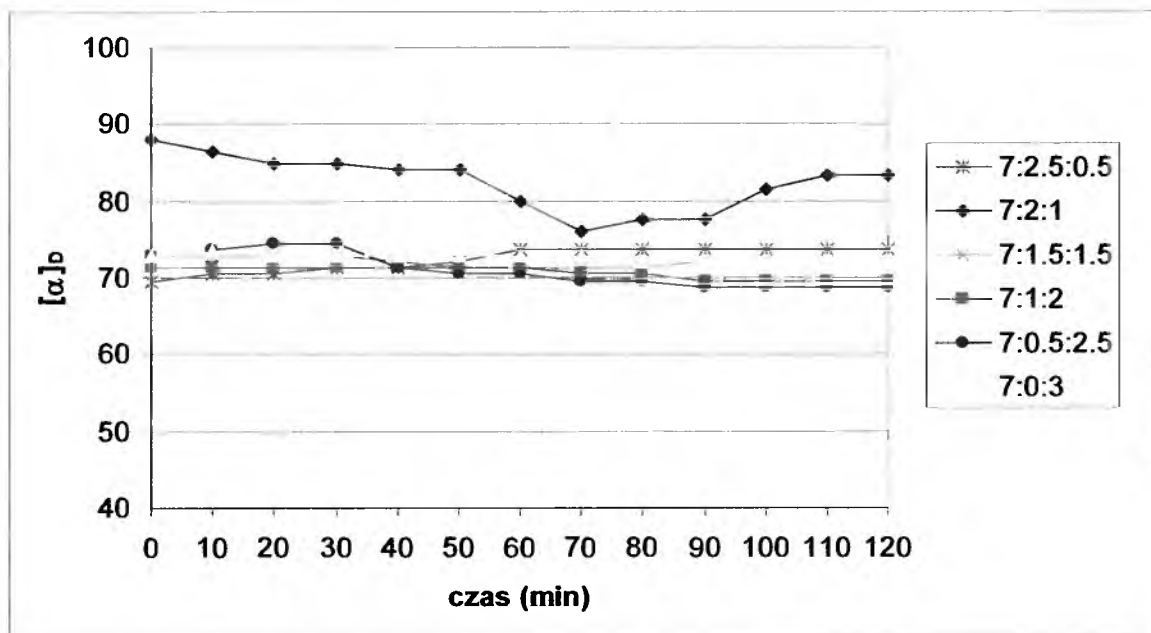
9.4.6.1. Środowisko kwaśne

Wyniki otrzymane techniką chromatografii cienkowarstwowej dla roztworów *S*-(+)-naproksenu rozpuszczonego w mieszaninie etanol – lodowaty kwas octowy (7:3, v/v) wyraźnie pokazują, że zmiany współczynnika opóźnienia R_F podczas 100 godzin przechowywania roztworu wahają się jedynie w granicach 0.86-0.88. Tak niewielkie zmiany można przypisać błędowi eksperymentalnemu, który w chromatografii cienkowarstwowej wynosi ± 0.02 wartości współczynnika opóźnienia R_F .



Rys.9.4.6.1.1. Zależność współczynnika opóźnienia R_F dla roztworu *S*-(+)-naproksenu rozpuszczonego w mieszaninie etanol – lodowaty kwas octowy (7:3, v/v) i przechowywanego w temperaturze $22 \pm 2^\circ\text{C}$ w funkcji czasu

Z kolei wyniki polarymetryczne, tzn. zmiany kąta skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego w sześciu roztworach o różnym stosunku objętościowym wody i lodowatego kwasu octowego, są zbieżne z wynikami otrzymanymi techniką chromatografii cienkowarstwowej. Generalnie obserwujemy wartości skręcalności właściwej utrzymujące się podczas trwania eksperymentu na stałym poziomie.

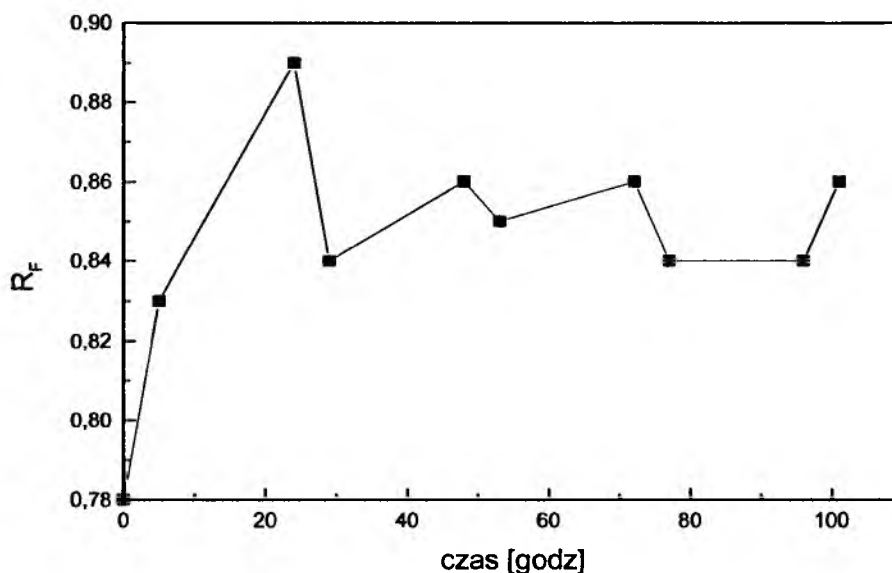


Rys.9.4.6.1.2. Zależność skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ dla roztworów *S*-(+)-naproksenu w sześciu mieszaninach etanol – lodowaty kwas octowy – woda (stosunki objętościowe podano na wykresie) i przechowywanych w temperaturze $22 \pm 2^\circ\text{C}$ w funkcji czasu

Ogólnie można stwierdzić, że środowisko kwaśne nie sprzyja żadnemu z dwóch wspomnianych w podrozdziale 9.4.5. mechanizmów reakcji. Wniosek taki można wysunąć na podstawie zaobserwowanej, niewielkiej zmiany współczynnika opóźnienia R_F , mieszczącej się w granicach błędu eksperymentalnego. Tę prawidłowość w pełni potwierdzają wyniki otrzymane metodą pomiaru skręcalności właściwej $[\alpha]_D$.

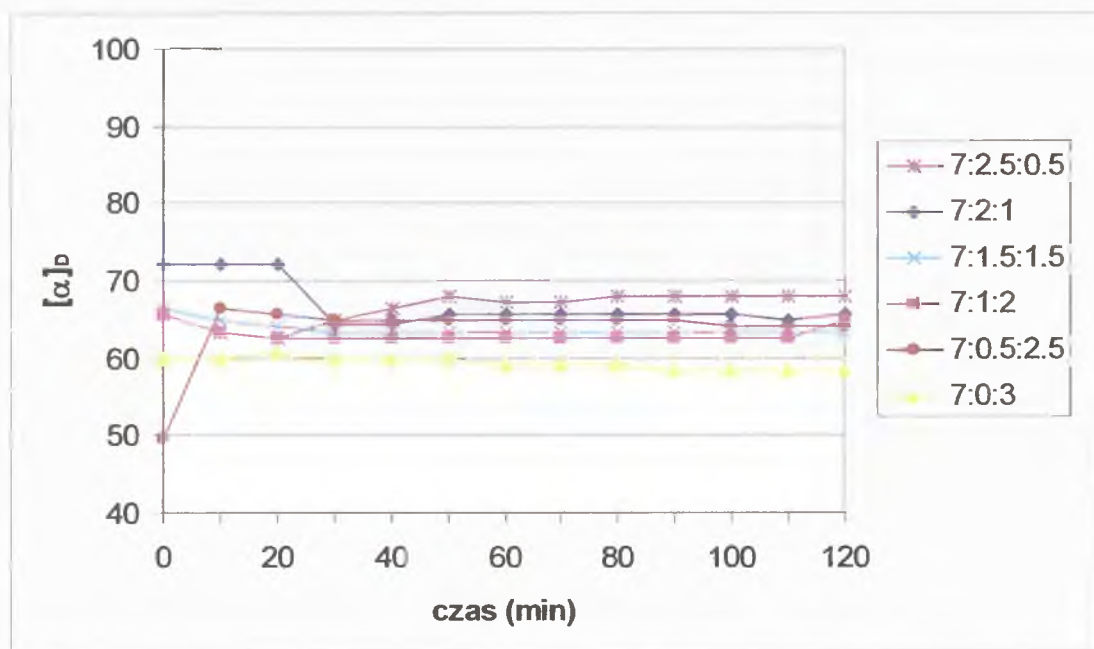
9.4.6.2. Środowisko zasadowe

Z zupełnie inną sytuacją spotykaliśmy się wówczas, gdy *S*-(+)-naproksen został rozpuszczony w mieszaninie etanol – bufor zasadowy (pH=9). W tym przypadku obserwowane zmiany współczynnika opóźnienia R_F były wyraźnie widocznie i znacznie wykaczały poza błąd doświadczalny.



Rys.9.4.6.2.1. Zależność współczynnika opóźnienia R_F dla roztworu *S*-(+)-naproksenu rozpuszczonego w mieszaninie etanol – bufor zasadowy (pH=9) (7:3, v/v) i przechowywanego w temperaturze $22\pm 2^\circ\text{C}$ w funkcji czasu

Wyniki pomiarów skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ w roztworze zasadowym nie są zbieżne z wynikami otrzymanymi techniką chromatografii cienkowarstwowej. Skręcalność właściwa roztworów *S*-(+)-naproksenu utrzymywała się praktycznie na stałym poziomie. Jednak należy uwzględnić fakt, iż pomiary techniką chromatograficzną były prowadzone w obu przypadkach (tzn. w przypadku zarówno środowiska zasadowego, jak i kwaśnego) przez okres 100 godzin, natomiast pomiary polarymetryczne przez okres jedynie 2 godzin (120 minut). Jest więc prawdopodobne, iż oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej *S*-(+)-naproksenu mogły rozpocząć się po upływie okresu dłuższego, niż 120, minut.

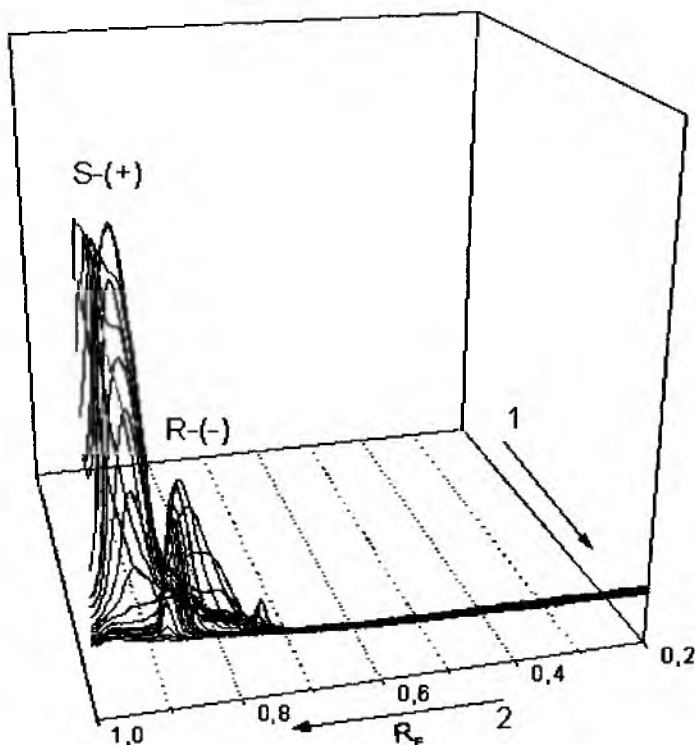


Rys.9.4.6.2.2. Zależność skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ dla roztworów *S*-(+)-naproksenu w sześciu mieszaninach etanol – bufor zasadowy (pH=9) – woda (stosunki objętościowe podano na wykresie) i przechowywanych w temperaturze $22 \pm 2^\circ\text{C}$ w funkcji czasu

Na podstawie otrzymanych techniką chromatografii cienkowarstwowej wyników można przypuszczać, że transenancjomeryzacja *S*-(+)-naproksenu jest wyraźnie uprzywilejowana w środowisku zasadowym. Wydaje się, że środowisko zasadowe katalizuje obserwowane przez nas zjawiska, natomiast środowisko kwaśne wyraźnie je inhibituje.

9.4.6.3. Rozdział enancjomerów *S*-(+) i *R*-(-) naproksenu

W celu dodatkowego potwierdzenia naszego wcześniejszego przypuszczenia, że obserwowane zmiany współczynnika opóźnienia R_F *S*-(+)-naproksenu są wynikiem transenancjomeryzacji, postanowiliśmy zastosować chromatografię dwukierunkową względem próbek roztworu *S*-(+)-naproksenu w środowisku zasadowym, gdyż asymetryczny profil stężeniowy tego analitu uzyskany techniką jednokierunkową sugerował możliwość osiągnięcia pełnego rozdziału dwóch antypodów. Na rysunku 9.4.6.3.1 przedstawiono trójwymiarowy wykres po dwukierunkowym rozwinięciu chromatogramu i densytometrycznym zeskanowaniu płytki.

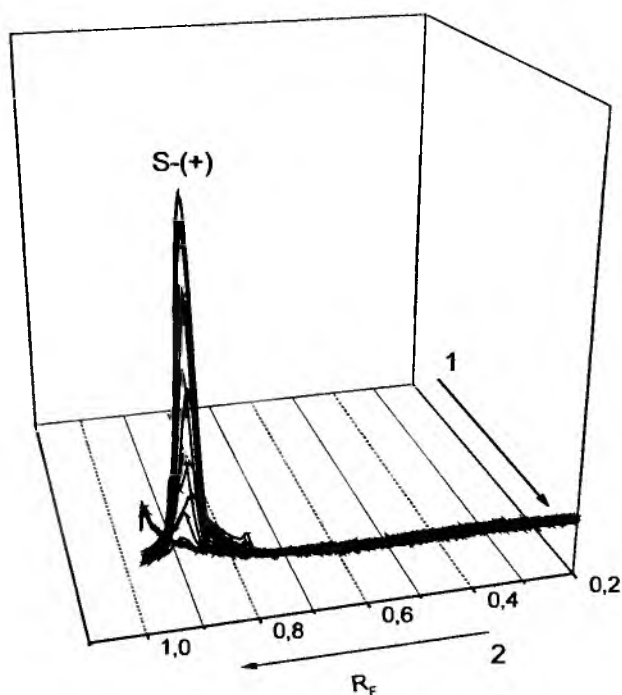


Rys.9.4.6.3.1. Trójwymiarowy schemat rozdziału dwóch enancjomerów naproksenu, uzyskany dzięki dwukierunkowemu rozwinięciu chromatogramu. Płytkę chromatograficzną była skanowana densytometrycznie w drugim kierunku rozwijania chromatogramu na szerokości 35 mm w odstępach 1,5 mm między poszczególnymi skanami. Badany roztwór był przechowywany przez okres 5 godzin w środowisku zasadowym

Jak to zostało pokazane na rysunku 9.4.6.3.1, dzięki zastosowaniu chromatografii dwukierunkowej istotnie udało się uzyskać pełny rozdział dwóch enancjomerów naproksenu.

Wartość współczynnika opóźnienia R_F dla $S-(+)$ -naproksenu wynosiła $0.90 (\pm 0.02)$, natomiast dla $R-(-)$ -naproksenu $0.82 (\pm 0.02)$. Wynik przedstawiony na rysunku 9.4.6.3.1 jest bardzo przekonującym dowodem na to, że w środowisku zasadowym $S-(+)$ -naproksen ulega transeanancjomeryzacji do $R-(-)$ -naproksenu.

Aby uzyskać pełne poparcie dla naszej hipotezy, że transeanancjomeryzacja jest promowana w środowisku zasadowym, przeprowadzono także rozwijanie techniką chromatografii dwukierunkowej roztworu $S-(+)$ -naproksenu przechowywanego w środowisku kwaśnym. Uzyskany wynik przedstawiono na rysunku 9.4.6.3.2.



Rys.9.4.6.3.2. Trójwymiarowy schemat chromatogramu $S-(+)$ -naproksenu, uzyskany dzięki dwukierunkowemu rozwinięciu chromatogramu. Płytkę chromatograficzną była skanowana densytometrycznie w drugim kierunku rozwijania chromatogramu na szerokości 35 mm w odstępach 1,5 mm między poszczególnymi skanami. Badany roztwór był przechowywany przez okres 5 godzin w środowisku kwaśnym

Na podstawie uzyskanych wyników można jednoznacznie stwierdzić, że w środowisku kwaśnym obecny jest tylko jeden izomer. Wartość współczynnika opóźnienia R_F dla tego pojedynczego pikiet wynosi $0.90 (\pm 0.02)$, co wyraźnie wskazuje na konfigurację S .

Zatem można z całą pewnością stwierdzić, że w środowisku kwaśnym nie zachodzi transenancjomeryzacja *S*-(+)-naproksenu.

Dzięki przeprowadzeniu systematycznych badań dotyczących faktycznego mechanizmu przejścia *S*-(+)-naproksenu w *R*-(-)-naproksen dostarczyliśmy wystarczającego dowodu doświadczalnego na to, że zmiana konfiguracji występuje w środowisku zasadowym. Jeśli natomiast chodzi o wybór jednego konkretnego mechanizmu, tj. tworzenie anionu enolanowego czy tautomeryzacja keto-enolowa, to w ramach przeprowadzonych przez nas badań chromatograficznych nie można tej kwestii jednoznacznie rozstrzygnąć.

Wydaje się być jednak uzasadnionym przypuszczenie, że analogiczny mechanizm transenancjomeryzacji występuje również w przypadku innych związków z grupy kwasów 2-arylopropionowych.

9.4.7. Badanie wybranych roztworów profenów technikami HPLC i ^1H NMR oraz badanie wiskozymetryczne. Związek między lepkością a oscylacyjnym mechanizmem reakcji chemicznych

W podrozdziałach 9.4.2. – 9.4.4. przedstawiono oscylacyjną transenancjomeryzację wybranych profenów, tj. *S*-(+)-ibuprofenu, *S*-(+)-naproksenu i kwasu *S,R*-(±)-2-fenylpropionowego, w kilku niskocząsteczkowych rozpuszczalnikach. Reakcje oscylacyjne są reakcjami rzadkimi i mogą być generowane przez różne czynniki, zarówno fizyczne, jak i chemiczne. Dlatego też w niniejszym podrozdziale podjęto próbę określenia warunków sprzyjających występowaniu oscylacyjnej transenancjomeryzacji profenów. Technikami analitycznymi wykorzystanymi do tego celu były wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC), spektroskopia magnetycznego rezonansu protonowego (^1H NMR) oraz wiskozymetria [15].

Jest rzeczą ogólnie wiadomą, że właściwością fizyczną często odpowiedzialną za pojawienie się reakcji oscylacyjnej jest lepkość roztworu, w jakim ta reakcja zachodzi. Celem badań prezentowanych w niniejszym podrozdziale było stwierdzenie, czy roztwory rozpatrywanych przez nas profenów w rozpuszczalnikach niskocząsteczkowych charakteryzują się podwyższoną lepkością i/lub wyraźnym uporządkowaniem w obrębie roztworu na poziomie molekularnym.

W omawianej w niniejszym podrozdziale części przeprowadzonego eksperymentu badanymi analitami były następujące związki: *S*-(+)-ibuprofen i *S*-(+)-naproksen.

Ponieważ przypuszczano, że właściwości reologiczne roztworów badanych profenów mogą być odpowiedzialne za oscylacyjną transenancjomeryzację, zmierzono i porównano lepkość sześciu specjalnie dobranych cieczy. Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono w tabeli 9.4.7.1.

Tabela 9.4.7.1. Lepkość dwóch rozpuszczalników oraz czterech roztworów *S*-(+)-naproksenu w tych rozpuszczalnikach w temperaturze 25±0.2°C

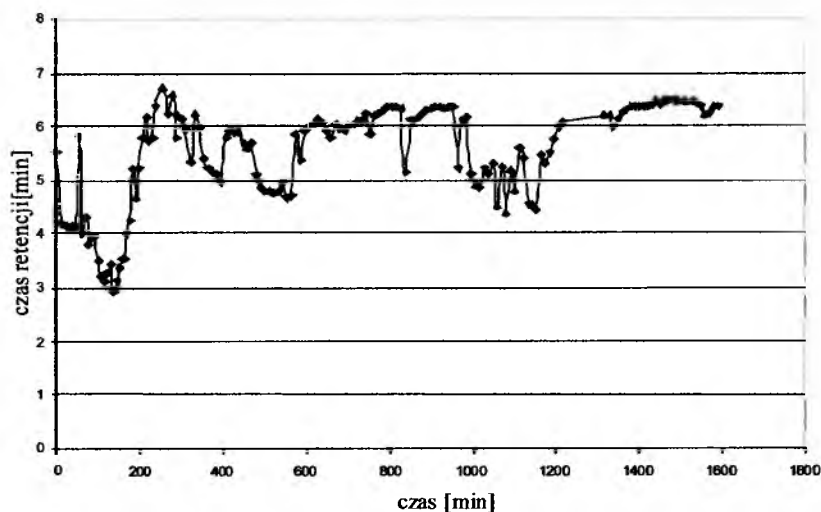
| Rozpuszczalnik/roztwór | Stężenie <i>S</i> -(+)-naproksenu [mol/dm ³] | Lepkość dynamiczna, η [cP] (\pm błąd względny w %) | Przyrost lepkości dynamicznej względem rozpuszczalnika (% $\Delta\eta$) |
|------------------------------------|----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| ACN | 0 | 0.76 (\pm 1.2 %) | - |
| ACN + <i>S</i> -(+)-naproksen | 4.3×10^{-3} | 0.78 (\pm 1.4 %) | 2.6 |
| ACN + <i>S</i> -(+)-naproksen | 2.15×10^{-2} | 0.80 (\pm 1.1 %) | 5.3 |
| 70% EtOH | 0 | 2.37 (\pm 0.5 %) | - |
| 70% EtOH + <i>S</i> -(+)-naproksen | 4.3×10^{-3} | 2.39 (\pm 0.5 %) | 0.8 |
| 70% EtOH + <i>S</i> -(+)-naproksen | 2.15×10^{-2} | 2.43 (\pm 0.6 %) | 2.5 |

Analizując wyniki przedstawione w tabeli 9.4.7.1 widać wyraźnie, że lepkość dynamiczna roztworów *S*-(+)-naproksenu w acetonitrylu jest znacząco większa, niż czystego acetonitrylu i wzrost ten wynosi ok. 5% w temperaturze 25±0.2°C. Wzrost lepkości dynamicznej dla roztworów *S*-(+)-naproksenu w 70% etanolu jest nieco mniejszy niż dla roztworów w acetonitrylu. Nie zmienia to jednak faktu, że *S*-(+)-naproksen rozpuszczony w acetonitrylu lub w 70% etanolu wyraźnie podnosi lepkość zastosowanych rozpuszczalników, co w efekcie końcowym może prowadzić do określonej samoorganizacji na poziomie molekularnym cząsteczek wchodzących w skład badanych roztworów. Można sądzić, że pozostałe, rozpatrywane profeny w podobny sposób zachowują się w roztworach z udziałem niskocząsteczkowych rozpuszczalników.

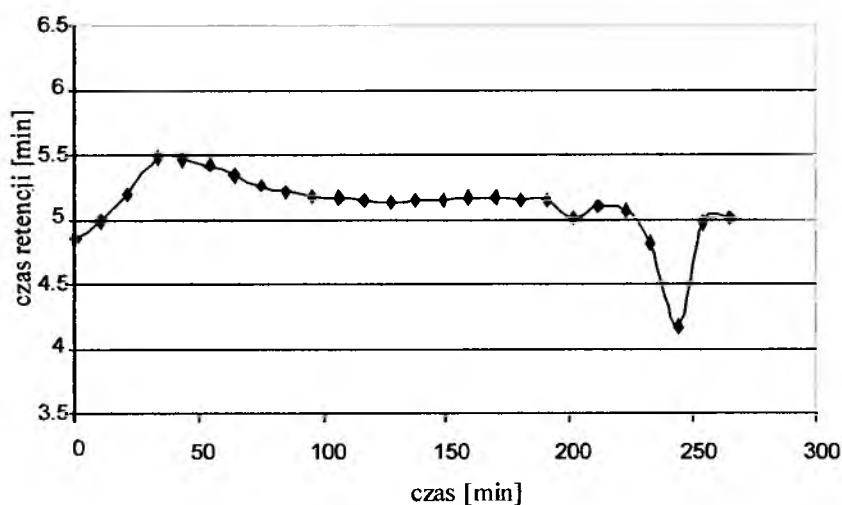
Kolejne badania zostały przeprowadzone techniką HPLC. Technika ta została najpierw zastosowana do dodatkowego potwierdzenia oscylacyjnej zmiany parametru retencyjnego analizowanych profenów w funkcji czasu przechowywania próbki w danym rozpuszczalniku, po raz pierwszy zaobserwowanej przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej.

Oscylacyjne zmiany czasu retencji (t_R) dla *S*-(+)-ibuprofenu przedstawiono na rysunkach 9.4.7.1 i 9.4.7.2, natomiast na rysunkach 9.4.7.3 i 9.4.7.4 przedstawiono profile stężeniowe *S*-(+)-ibuprofenu i *S*-(+)-naproksenu w przypadku, gdy zarówno

rozpuszczalnikiem tych związków, jak i fazą ruchomą był acetonitryl. W niniejszym podrozdziale przykładowo podane zostały wyniki badań zmiany parametru retencyjnego (czas retencji, t_R) w funkcji czasu przechowywania próbki *S*-(+)-ibuprofenu w 70% roztworze etanolu (rys.9.4.7.1) lub w acetonitrylu (rys.9.4.7.2). W obu tych przypadkach kolejne próbki o objętości 5 μ L były wstrzykiwane na kolumnę chromatograficzną automatycznie i w równych odstępach czasu, po uprzednim pobraniu ich z jednego i tego samego naczynia.



Rys.9.4.7.1. Zależność zmiany czasu retencji t_R dla *S*-(+)- ibuprofenu w czasie jego przechowywania, w temperaturze $22 \pm 2^\circ\text{C}$; rejestracja przy długości fali $\lambda = 225\text{ nm}$. Rozpuszczalnikiem *S*-(+)- ibuprofenu był 70% etanol, a fazą ruchomą acetonitryl – woda (6:4, v/v)



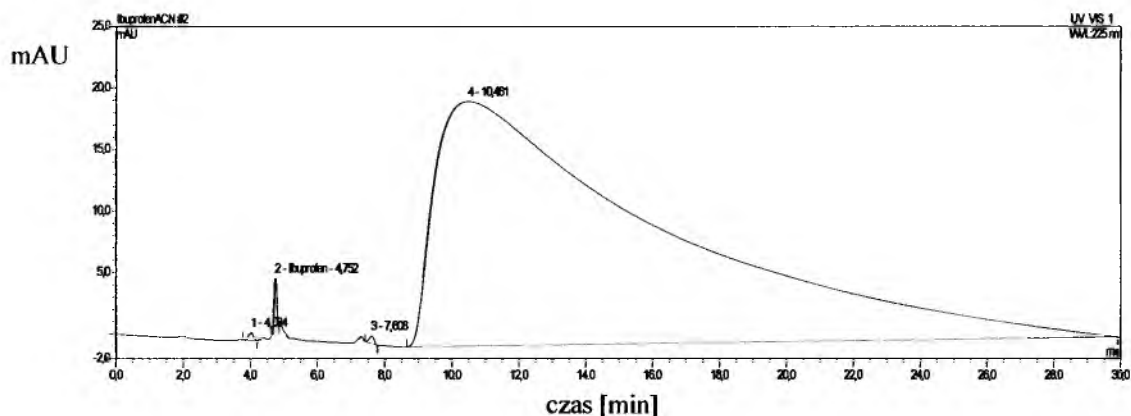
Rys.9.4.7.2. Zależność zmiany czasu retencji t_R dla *S*-(+)- ibuprofenu w czasie jego przechowywania, w temperaturze $22 \pm 2^\circ\text{C}$; rejestracja przy długości fali $\lambda = 225\text{ nm}$. Rozpuszczalnikiem *S*-(+)- ibuprofenu był acetonitryl, a fazą ruchomą acetonitryl – woda (6:4, v/v)

Wyniki przedstawione na rysunkach 9.4.7.1 i 9.4.7.2 przedstawiają oscylacyjne zmiany czasu retencji *S*-(+)-ibuprofenu w funkcji czasu przechowywania jego roztworu w różnych rozpuszczalnikach.

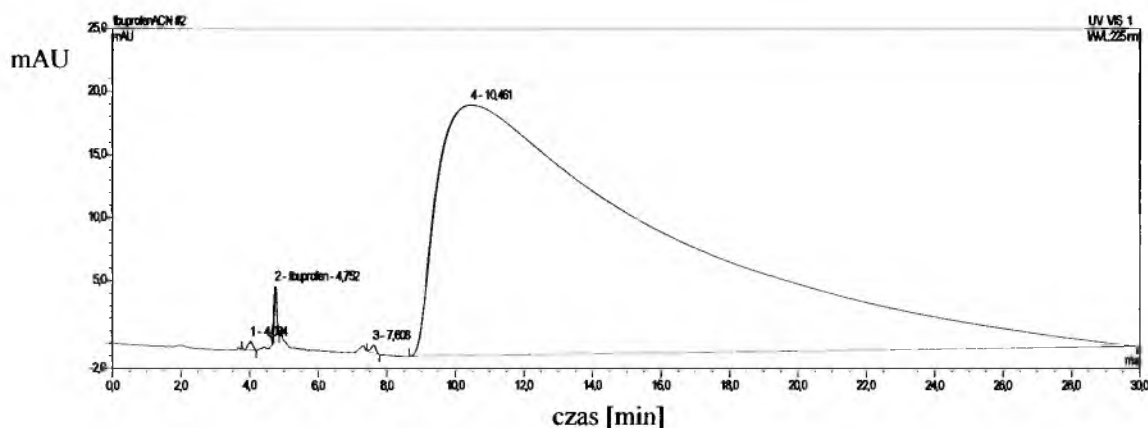
Z porównania wyników przedstawionych na rysunkach 9.4.7.1 i 9.4.7.2 można wnioskować, że amplituda oscylacyjnych zmian czasu retencji (t_R) jest większa w przypadku, gdy woda jest zawarta zarówno w rozpuszczalniku próbki, jak i w fazie ruchomej (rys.9.4.7.1). Mniejsza amplituda oscylacyjnych zmian czasu retencji (t_R) występuje w przypadku układu, w którym rozpuszczalnik ibuprofenu jest niewodny, natomiast faza ruchoma zawiera wodę (rys.9.4.7.2). I tak w przypadku roztworu *S*-(+)-ibuprofenu w 70% etanolu maksymalna różnica czasów retencji (t_R) wynosiła ok. 3.9 [min]. Dla roztworu *S*-(+)-ibuprofenu w acetonitrylu maksymalna różnica czasów retencji (t_R) wynosiła ok. 1.3 [min]. W przypadku próbek nie ulegających oscylacji czasy retencji są stałe do drugiego miejsca po przecinku dla minut jako podstawowych jednostek pomiaru. Widać zatem wyraźnie, że otrzymane przez nas wyniki wykraczają poza błąd eksperymentalny wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

Dodatkowo porównując okres zaobserwowanych oscylacji należy podkreślić, że jest on znacząco krótszy w przypadku roztworu *S*-(+)-ibuprofenu w 70% etanolu (rys.9.4.7.1). Taki sam wniosek można wyciągnąć porównując wyniki z podrozdziału 9.4.2 i 9.4.3. otrzymane techniką chromatografii cienkowarstwowej. Zatem po raz kolejny udało się doświadczalnie udowodnić, że amplituda obserwowanych oscylacji jest znacząco większa w przypadku wodnych rozpuszczalników i wodnych faz ruchomych, natomiast szybkość tych zmian jest w tych przypadkach znacznie większa (czyli „okres” oscylacyjnych pseudosinusoid jest znacznie krótszy).

Wysokosprawna chromatografia cieczowa została zastosowana także do chromatografowania roztworów acetonitrylowych *S*-(+)-ibuprofenu i *S*-(+)-naproksenu, gdzie fazą ruchomą był także acetonitryl. Wyniki przeprowadzonych badań zostały przedstawione na rysunkach 9.4.7.3 i 9.4.7.4.



Rys.9.4.7.3. Chromatogram przedstawiający „ogonowanie” dla roztworu *S*-(+)-ibuprofenu w acetonitrylu. Zastosowaną fazą ruchomą był czysty acetonitryl

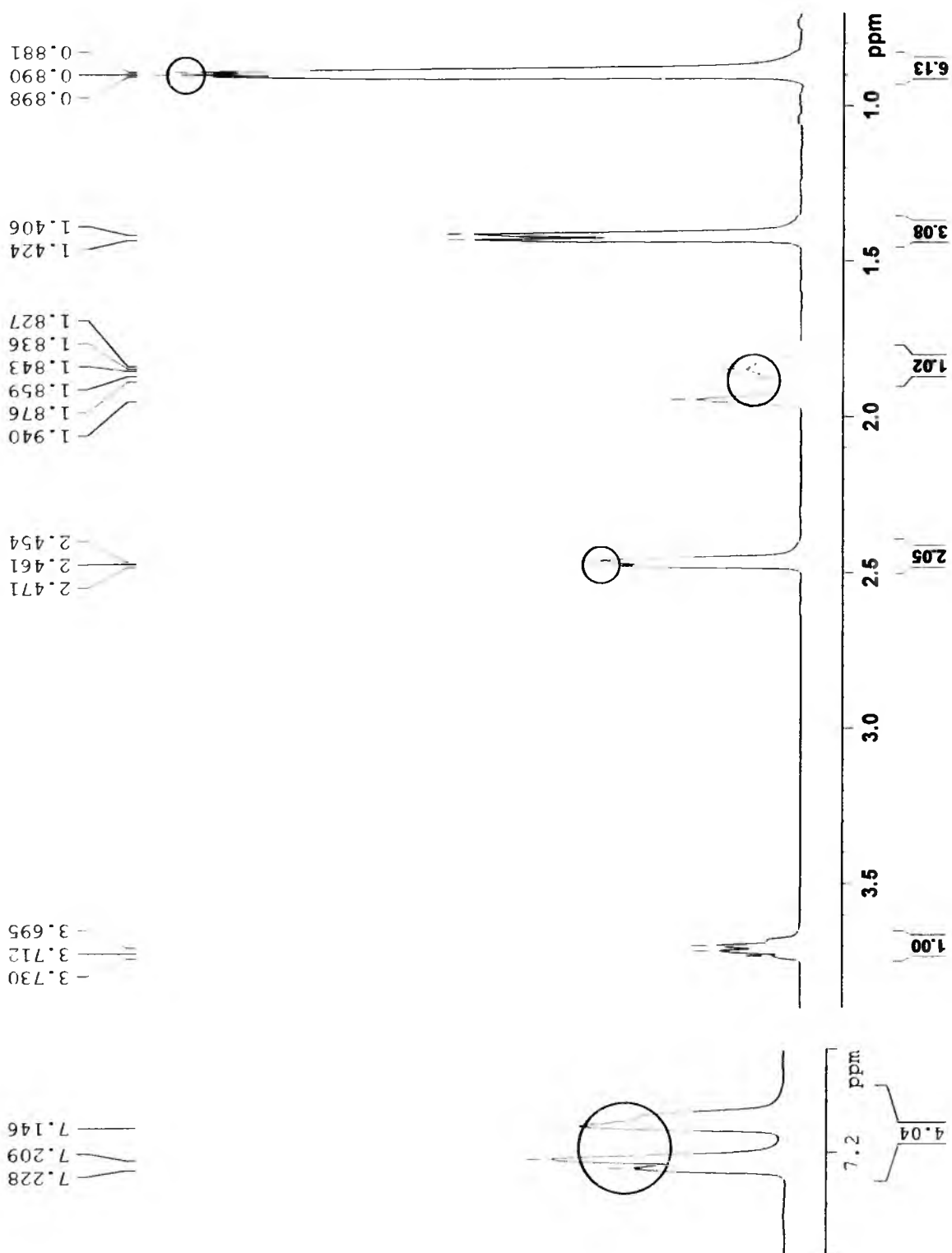


Rys.9.4.7.4. Chromatogram przedstawiający „ogonowanie” dla roztworu *S*-(+)-naproksenu w acetonitrylu. Zastosowaną fazą ruchomą był czysty acetonitryl

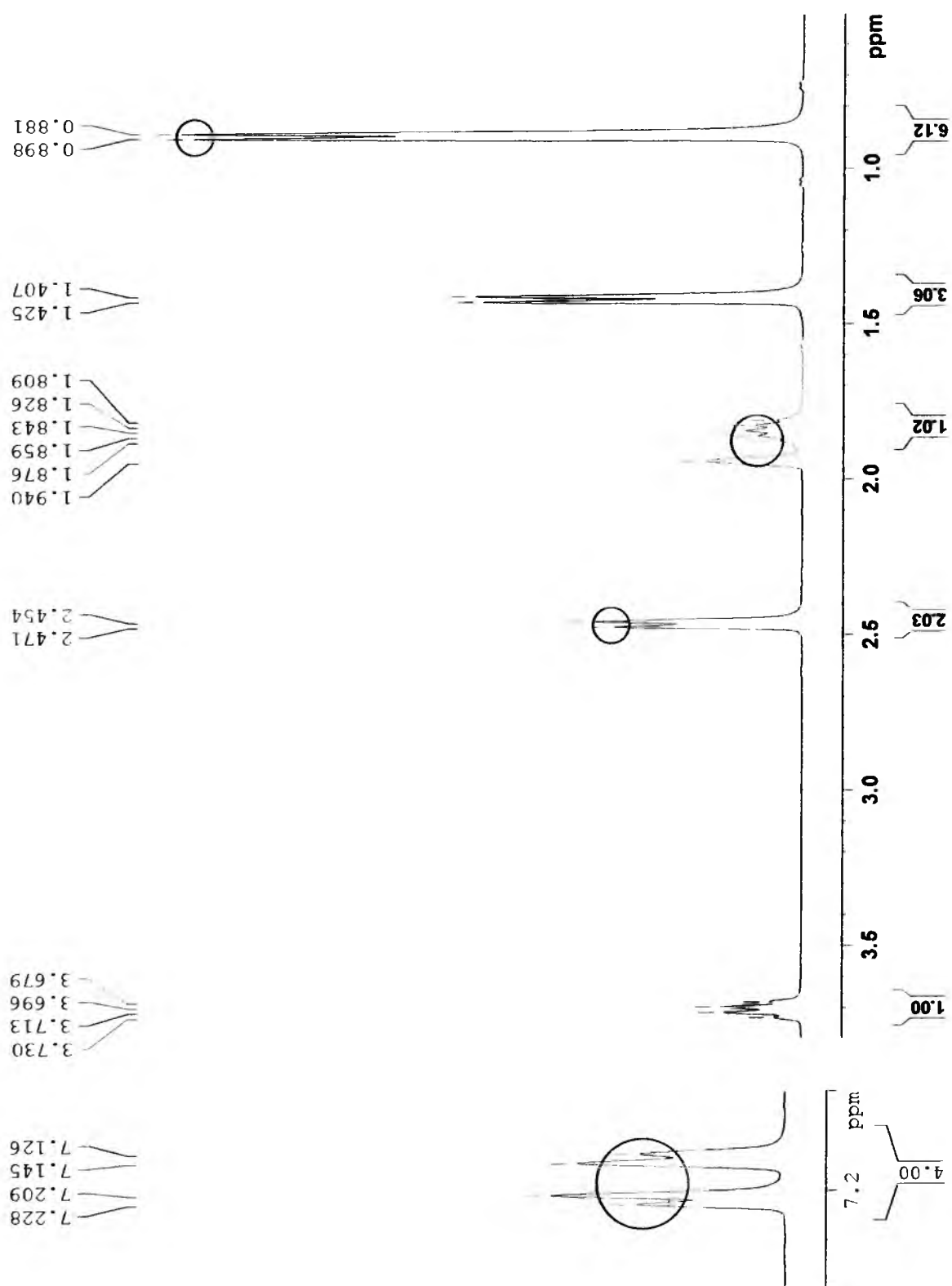
Na rysunkach 9.4.7.3 i 9.4.7.4 przedstawiono chromatogramy, jakie otrzymano dla roztworów *S*-(+)-ibuprofenu i *S*-(+)-naproksenu, obu sporządzonych w acetonitrylu. Dokonując analizy obu tych profili stężeniowych można stwierdzić, że mamy tutaj do czynienia z rozmyciem profili stężeniowych, czyli z tzw. „ogonowaniem”. Przyczyną obserwowanego przez nas zjawiska jest podwyższona lepkość roztworów badanych profenów. Lepka próbka profenu migruje wzdłuż kolumny chromatograficznej z widoczną trudnością polegającą na tym, że elucja może trwać do kilkudziesięciu minut, a nawet ponad godzinę. Nawet po dłuższym przemywaniu kolumny chromatograficznej czystym acetonitrylem nadal nie można przywrócić właściwości rozdzielczych kolumny chromatograficznej RP-18. Prawdopodobnie dzieje się tak dlatego, że cała powierzchnia zewnętrzna ziaren wypełnienia kolumny i być może wewnętrzna powierzchnia porów wypełnienia jest pokryta lepkiem roztworem profenu, co utrudnia retencję i silnie podnosi

ciśnienie fazy ruchomej w kolumnie. Dopiero po dłuższym przemywaniu kolumny chromatograficznej mieszaniną metanolowo-wodną udało się przywrócić właściwą rozdzielczość kolumny chromatograficznej RP-18.

Celem kolejnego badania było dalsze potwierdzenie znaczącej samoorganizacji molekuł roztworów badanych profenów. Znacząca lepkość roztworów *S*-(+)-ibuprofenu w niskocząsteczkowym rozpuszczalniku, jakim był zdeuterowany acetonitryl, została zademonstrowana przy pomocy spektroskopii magnetycznego rezonansu protonowego (^1H NMR). Widma ^1H NMR zostały zarejestrowane w dwóch różnych wariantach, tj. z użyciem ruchomego (rys.9.4.7.5) i nieruchomego zgłębnika (rys.9.4.7.6).



Rys.9.4.7.5. Widmo ^1H NMR dla *S*-(+)-ibuprofenu rozpuszczonego w zdeuterowanym acetonitrylu (CD_3CN) zarejestrowane z użyciem obrotowego zgłębnika. Kółka oznaczają obszary, dla których rejestracja widma z użyciem obrotowego zgłębnika była szczególnie niedokładna (tj. rozdział poszczególnych sygnałów był niekompletny)



Rys.9.4.7.6. Widmo ^1H NMR dla *S*-(+)-ibuprofenu rozpuszczonego w zdeuterowanym acetonitrylu (CD_3CN) zarejestrowane z użyciem nieruchomego zgłębnika. Kółka oznaczają obszary, dla których rejestracja widma z użyciem nieruchomego zgłębnika uległa znaczącej poprawie

Z porównanie obu tych widm przedstawionych na rysunku 9.4.7.5 i 9.4.7.6 jasno wynika, że widmo zarejestrowane z użyciem ruchomego zgłębnika jest widmem niższej jakości, z niektórymi sygnałami multipletowymi słabo rozdzielonymi, lub czasem nie rozdzielonymi w ogóle. Inaczej wygląda widmo zarejestrowane z użyciem nieruchomego zgłębnika (widma są tak rejestrowane wówczas gdy badamy próbki ciał stałych), ponieważ wszystkie występujące w nim sygnały multipletowe są dobrze rozdzielone. Zatem udało się po raz kolejny wykazać, iż ciekły roztwór *S*-(+)-ibuprofenu w rozpuszczalniku niskocząsteczkowym cechuje się znacznym uporządkowaniem molekularnym, odróżniającym go w sposób wyraźny od zwykłego roztworu izotropowego.

Dzięki zastosowaniu wiskozymetrii, wysokosprawnej chromatografii cieczowej i spektroskopii magnetycznego rezonansu protonowego udało się uzyskać przekonujące dowody na to, że badane przez nas profeny, rozpuszczone w niskocząsteczkowych rozpuszczalnikach posiadają pewne cechy żelatorów.

Z przedstawionych w niniejszym podrozdziale wyników można wyprowadzić wnioski, iż roztwory profenów w rozpuszczalnikach niskocząsteczkowych (jak np. 70% etanol, dichlorometan, acetonitryl itp.) cechują się znacznym stopniem uporządkowania na poziomie molekularnym i że nie są to roztwory w pełni izotropowe. Szczególnie wyniki pomiarów spektroskopowych techniką ^1H NMR mogą zaświadczyć o anizotropii roztworu *S*-(+)-ibuprofenu w zdeuterowanym acetonitrylu. Rezultaty pomiarów wiskozymetrycznych, a zwłaszcza rezultaty pomiarów przeprowadzonych techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej również wskazują na znaczące uporządkowanie molekularne w roztworach badanych profenów. Wydaje się, iż przynajmniej w przypadku części eksperymentów, przeprowadzonych w ramach niniejszego studium nad transenancjomeryzacją wybranych profenów w roztworach (jak np. badania prowadzone techniką TLC w temperaturze $6 \pm 2^\circ\text{C}$, czy też badania nad kształtem profili stężeniowych analitów, prowadzone techniką HPLC) roztwory profenów cechowały się bardzo wyraźnie podwyższoną lepkością. Dlatego też można sądzić, iż podwyższona lepkość i/lub uporządkowanie molekularne roztworów profenów stanowią przyczynę generowania oscylacji w przypadku transenancjomeryzacji tych związków.

Z tego, co dotychczas wiadomo o reakcjach oscylacyjnych, pojawiają się one zwłaszcza w takich układach, w których procesy chemiczne bieżą kilkietapowo (w tym przynajmniej dwuetapowo) i kiedy na dodatek następuje określone sprzężenie kinetyki oraz dyfuzji. W układach ciekłych o anizotropowym rozmieszczeniu cząsteczek dyfuzja

molekularna jednego (lub więcej) produktu pośredniego przebiega z różną prędkością w różnych kierunkach. Taka sytuacja powoduje niejednorodny rozkład produktu pośredniego w przestrzeni (x,y,z) , co czyni jego stężenie nie tylko funkcją czasu, ale funkcją wielu zmiennych $[C = f(x,y,z,t)]$. Wiadomo też, że sprzężenie kinetyki reakcji chemicznych z dyfuzją produktów pośrednich może prowadzić do zdestabilizowania jednorodnego stanu stacjonarnego i do powstawania uporządkowań przestrzennych – stacjonarnych i niestacjonarnych (czyli fal chemicznych). Spostrzeżenie odnoszące się do struktur stacjonarnych zostało dokonane przez wybitnego matematyka brytyjskiego Alana Turinga i nosi nazwę struktur Turinga, natomiast utrata stabilności jednorodnego układu stacjonarnego nosi nazwę bifurkacji Turinga. Z kolei uporządkowania przestrzenne powodują oscylacyjne zmiany stężenia produktu pośredniego w funkcji czasu.

W przypadku rozpatrywanych w niniejszej pracy procesów transenancjomeryzacji profenów produktem pośrednim – jak to wynika z treści podrozdziału 9.4.5. – może być przede wszystkim jon enolanowy i/lub keto-enol pochodny danego profenu. Brak pewności co do natury chemicznej produktu pośredniego (lub produktów pośrednich) i wynikający stąd brak pewności co do poszczególnych kroków elementarnych tego procesu, a także brak znajomości stałych kinetycznych (k) tych kroków nie pozwalają na zaproponowanie żadnego szczegółowego modelu oscylatora, który mógłby odzwierciedlać oscylacyjną transenancjomeryzację profenów. Można jedynie przedstawić pewien bardzo uproszczony schemat ogólny procesu badanych w niniejszej pracy oscylacji. Wiadomo mianowicie, iż uwzględnienie dyfuzji w równaniach kinetycznych określonych procesów chemicznych polega na dodaniu do nich członu wynikającego z II prawa Ficka. W najprostszym przypadku dyfuzji zależnej tylko od jednej współrzędnej przestrzennej x , równanie na szybkość zmian stężenia jonu enolanowego (lub alternatywnie keto-enolu) przyjmie następującą postać ogólną:

$$\frac{\partial[\text{jon enolanowy}]}{\partial t} = (\text{suma cząstkowych szybkości przemian z udziałem jonu enolanowego ze względu na stężenie reagentów}) + D_m \times \frac{\partial^2[\text{jon enolanowy}]}{\partial x^2} \quad (9.4.7.1)$$

gdzie D_m oznacza współczynnik dyfuzji jonu enolanowego (lub keto-enolu) w środowisku reakcji, a pochodne, z uwagi na zależność stężenia jonu enolanowego od więcej niż jednej zmiennej przybierają tutaj charakter cząstkowy. W rzeczywistości należy oczekiwać, iż dyfuzja produktu pośredniego zależy, aczkolwiek prawdopodobnie w nierównym stopniu, od wszystkich trzech współrzędnych przestrzennych, x , y i z , co stanowi dodatkową i to bardzo

znaczną komplikację modelu oscylatora transenancjomeryzacji profenów. Na koniec jest rzeczą oczywistą, iż tego rodzaju skomplikowane układy nieliniowe posiadają rozwiązania wyłącznie numeryczne.

Wydaje się, iż można słusznie oczekiwać, że oscylacyjne zmiany stężenia produktu pośredniego (jakim jest jon enolanowy i/lub keto-enol pochodny danego profenu) mogą w rozpatrywanych w niniejszej pracy reakcjach przekładać się na oscylacyjne zmiany stężenia substratu (enancjomeru $S-(+)$) oraz produktu (enancjomeru $R-(-)$) procesu transenancjomeryzacji w funkcji czasu. Prawdopodobnie zjawisko oscylacyjnej transenancjomeryzacji profenów może być szczegółowo opisane przy pomocy modelu oscylatora, w pełni analogicznego w swoim charakterze do teoretycznego modelu Prigogine'a, znanego jako Brukselator z członem dyfuzyjnym. Aby jednak móc skonstruować konkretny model oscylatora transenancjomeryzacji profenów, potrzeba bardzo wielu dodatkowych badań oraz szczegółowych danych na temat mechanizmu i kinetyki wszystkich kroków elementarnych tego procesu.

9.4.8. O możliwości przeprowadzenia dwuwymiarowego rozdziału antymerów wybranych profenów techniką jednokierunkowej chromatografii cienkowarstwowej

We wcześniejszych podrozdziałach szczegółowo omówiono zachowanie próbek kwasów 2-arylopropionowych, tj. *S*-(+)-ibuprofenu, *S*-(+)-naproksenu i kwasu *S*,*R*-(±)-2-fenylpropionowego, przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej. Roztwory *S*-(+)-ibuprofenu, *S*-(+)-naproksenu i kwasu *S*,*R*-(±)-2-fenylpropionowego w niskocząsteczkowych rozpuszczalnikach wodnych i w rozpuszczalniku niewodnym były przechowywane przez okres kilkudziesięciu godzin. Roztwory te były wielokrotnie chromatografowane w kilkugodzinnych odstępach czasu. Wyniki przeprowadzonych badań prowadzą do wniosku, że zarówno pojedyncze enancjomery (*S*-(+)-ibuprofen i *S*-(+)-naproksen), jak i mieszanina racemiczna (kwas *S*,*R*-(±)-2-fenylpropionowy) ulegają w środowisku wodnym oraz w środowisku niewodnym oscylacyjnej transenancjomeryzacji. Jednokierunkowe rozwijanie chromatogramów wybranych profenów było prowadzone w celu zbadania oscylacyjnej transenancjomeryzacji, natomiast chromatografia dwukierunkowa była stosowana względem tych próbek profenów, dla których asymetryczny kształt profili stężeniowych po jednokierunkowym rozwinięciu chromatogramu wskazywał na możliwość uzyskania pełnego rozdziału enancjomerów w drugim kierunku.

W niniejszym podrozdziale przedstawiono możliwość dwuwymiarowego rozdziału antymerów wybranych profenów techniką jednokierunkowej chromatografii cienkowarstwowej [16]. Analitami testowymi były *S*,*R*-(±)-ibuprofen, *S*-(+)-naproksen (po uprzedniej racemizacji pod wpływem przechowywania jego roztworu w roztworze etanolu i buforu o pH = 9 (7:3, v/v)) i kwas *S*,*R*-(±)-2-fenylpropionowy.

Dwuwymiarowy rozdział wybranych par profenów techniką jednokierunkowej chromatografii cienkowarstwowej jest przede wszystkim możliwy wówczas, gdy pasma chromatograficzne dwóch enancjomerów badanego związku ulegają odchyleniu w przeciwne strony względem pionowego kierunku rozwijania chromatogramu. Znikome odchylenie pasm chromatograficznych dowolnych analitów, tak chiralnych, jak i niechiralnych, od pionowego kierunku rozwijania chromatogramu bywa obserwowane przede wszystkim w przypadku płytek chromatograficznych ręcznie pokrytych warstwą adsorbenta. Wielkość tych odchyłeń mieści się w przedziale od 1 do 2 milimetrów. Natomiast, jeśli chodzi o płytki chromatograficzne komercyjnie dostępne, to zgodnie z naszym stanem wiedzy brak jest jakichkolwiek doniesień literaturowych na temat możliwości odchylenia pasm chromatograficznych względem pionowego kierunku rozwijania chromatogramu.

W przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy badaniach nie można mówić o przypadku, ponieważ otrzymane wyniki charakteryzowały się dużą powtarzalnością, a wielkość odchylenia była większa niż ta, jaką przewidują dopuszczalne normy. We wstępnej fazie przeprowadzonego eksperymentu sprawdziliśmy przy pomocy poziomicy położenie powierzchni stołu laboratoryjnego i to, czy jest ona całkowicie pozioma. W przypadku nachylenia powierzchni stołu względem poziomu droga migracji dowolnego analitu – chiralnego lub niechiralnego – nie przebiegałaby bowiem równolegle do bocznych krawędzi płytki chromatograficznej, lecz obserwowane odchylenie boczne nie miałoby nic wspólnego z molekularnym mechanizmem retencji tych związków.

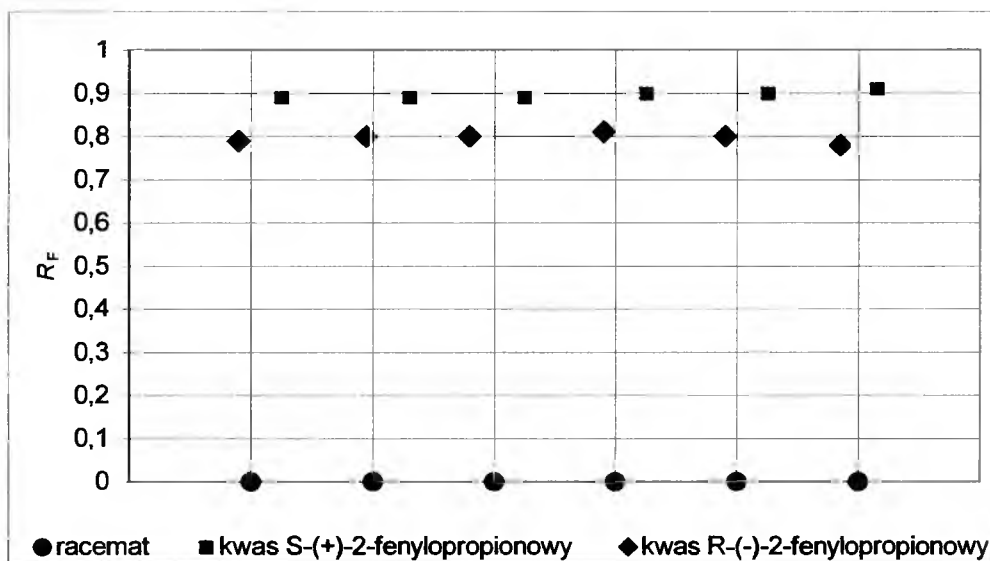
Rozdziały chiralne *S,R*-(±)-ibuprofenu, *S,R*-(±)-naproksenu i kwasu *S,R*-(±)-2-fenylpropionowego dostarczyły bardzo przekonującego dowodu na występowanie wyraźnego odchylenia drogi migracji pasm chromatograficznych poszczególnych enancjomerów w dwóch przeciwnych kierunkach, prostopadle względem kierunku rozwijania chromatogramu. Wyniki przeprowadzonych badań zostały przedstawione w tabeli 9.4.8.1.

Tabela 9.4.8.1. Boczne odchylenie kierunku migracji pasm chromatograficznych dla par antymerów ibuprofenu, naproksenu i kwasu 2-fenylpropionowego względem pionowego kierunku rozwijania chromatogramu

| Analit | Konfiguracja enancjomeru | Wartość współczynnika opóźnienia R_F | Odchylenie [mm] | Kierunek odchylenia |
|------------------------|--------------------------|----------------------------------------|-----------------|---------------------|
| Ibuprofen | <i>S</i> -(+) | 0.91 (±0.02) | 2 (±1) | w prawo |
| | <i>R</i> -(-) | 0.88 (±0.02) | 2 (±1) | w lewo |
| Naproksen | <i>S</i> -(+) | 0.89 (±0.02) | 3 (±1) | w lewo |
| | <i>R</i> -(-) | 0.85 (±0.02) | 3 (±1) | w prawo |
| Kwas 2-fenylpropionowy | <i>S</i> -(+) | 0.90 (±0.02) | 5 (±1) | w prawo |
| | <i>R</i> -(-) | 0.80 (±0.02) | 2 (±1) | w lewo |

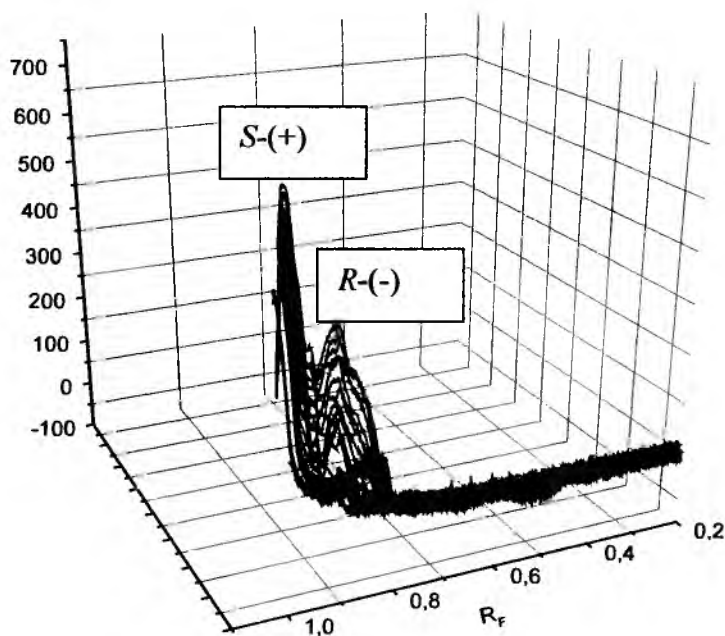
Wyniki zebrane w tabeli 9.4.8.1 przedstawiają wielkość odchylenia bocznego pasm chromatograficznych trzech wybranych par antymerów kwasów 2-arylopropionowych względem kierunku rozwijania chromatogramu.

Wynikiem odchylenia od pionowego kierunku rozwijania chromatogramu poszczególnych pasm chromatograficznych dla enancjomerów wybranych profenów jest niewątpliwa poprawa rozdziału chromatograficznego. Przykładowo uzyskany w badanych warunkach rozdział chromatograficzny antymerów ibuprofenu charakteryzuje się różnicą współczynników opóźnienia $\Delta R_F = 0.03$, natomiast odchylenie dwóch pasm chromatograficznych względem siebie wyniosło $4 (\pm 2)$ mm odpowiednio w prawą i lewą stronę. Podobny wynik otrzymali Bhushan i Parshad [1], jednak nie skomentowali oni otrzymanego rezultatu, a odchylenie drogi migracji dwóch enancjomerów ibuprofenu od pionu jedynie pokazali na fotografii (rys.1 w publikacji [1]). Rozdział antymerów naproksenu charakteryzuje się nieco większą, niż rozdział antymerów ibuprofenu, różnicą współczynników opóźnienia $\Delta R_F = 0.04$ oraz większym odchyleniem bocznym dwóch pasm chromatograficznych względem siebie, wynoszącym $6 (\pm 2)$ mm. Różnica między współczynnikami opóźnienia R_F dwóch antypodów kwasu 2-fenylpropionowego wynosiła $\Delta R_F = 0.10$, a boczne odchylenie dwóch pasm chromatograficznych wyniosło $7 (\pm 2)$ mm. Na rysunku 9.4.8.1 przedstawiono w sposób schematyczny boczne odchylenia dwóch pasm chromatograficznych dla antymerów kwasu 2-fenylpropionowego. Podobne chromatogramy do tego przedstawionego na rysunku 9.4.8.1 otrzymano także dla ibuprofenu i naproksenu.

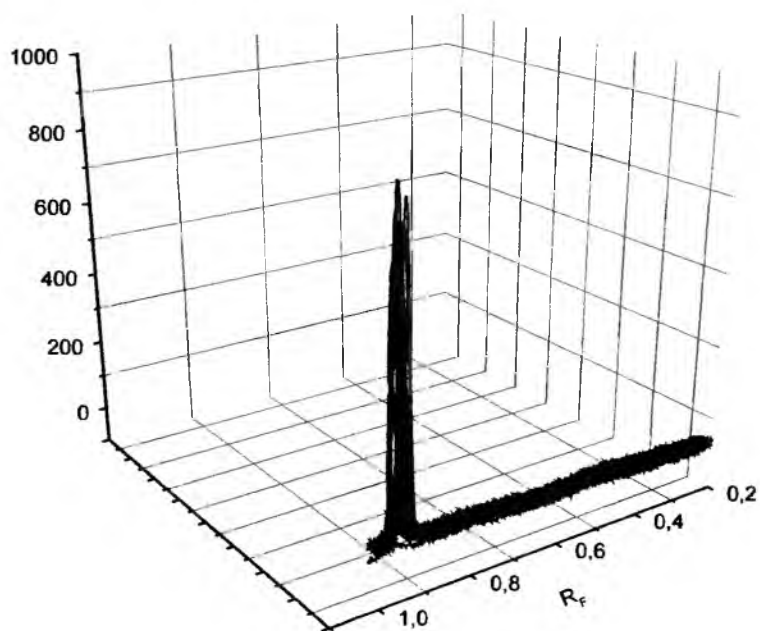


Rys.9.4.8.1. Schemat bocznych odchyłeń pasm chromatograficznych od pionowego kierunku rozwijania chromatogramu dla dwóch antymerów kwasu 2-fenylpropionowego, rozdzielanego na gotowej płytce chromatograficznej pokrytej żelazem krzemionkowym i zaimpregnowanej L-argininą (schemat przedstawia płytkę chromatograficzną, na którą naniesiono sześć jednakowych próbek mieszaniny racemicznej kwasu 2-fenylpropionowego)

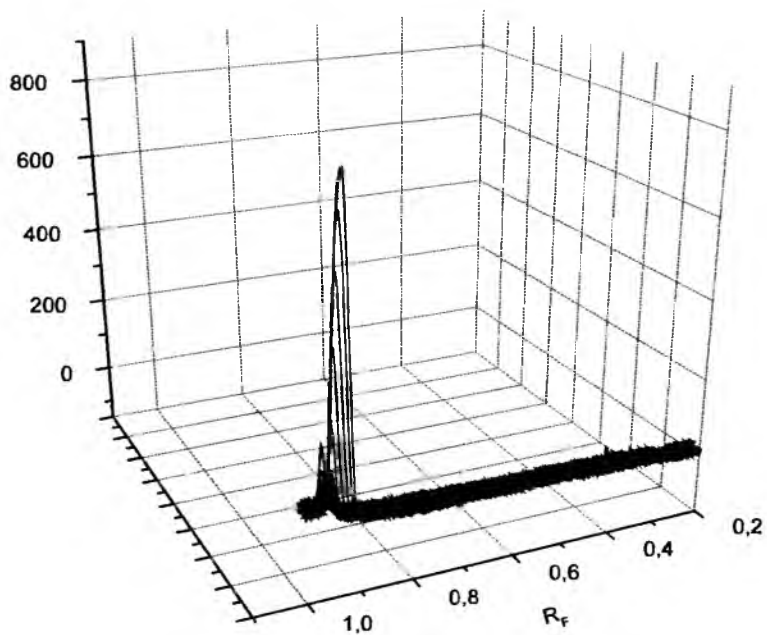
Dzięki skanowaniu płytek chromatograficznych w odstępach 1 mm między poszczególnymi skanami udało się odtworzyć trójwymiarowe profile stężeniowe dwóch antymerów kwasu 2-fenylopropionowego (rys.9.4.8.2) oraz trójwymiarowe profile stężeniowe dwóch antymerów naproksenu (rys.9.4.8.3a i b). Odtworzenie tych trójwymiarowych profili umożliwiło lepszą wizualizację rozkładu stężenia poszczególnych antymerów ze względu na boczne odchylenia odpowiednich pasm od pionowego kierunku rozwijania chromatogramu.



Rys.9.4.8.2. Trójwymiarowy schemat profili stężeniowych dla kwasu $S-(+)$ -2-fenylopropionowego (odchylenie w prawo) i dla kwasu $R-(-)$ -2-fenylopropionowego (odchylenie w lewo)



(a)



(b)

Rys.9.4.8.3. Trójwymiarowy schemat profili stężeniowych dla (a) *S*-(+)-naproksenu (odchylenie w lewo) i dla (b) *R*-(-)-naproksenu (odchylenie w prawo)

W przypadku ibuprofenu rozdział jednokierunkowy okazał się niewystarczający ($\Delta R_F = 0.03$), aby można było otrzymać trójwymiarowe profile stężeniowe obu antymerów, podobne do tych prezentowanych na rysunkach 9.4.8.2 i 9.4.8.3. Lepszy rozdział dwóch antymerów ibuprofenu jest możliwy w przypadku dwukierunkowego rozwijania chromatogramu, co zostało wcześniej zaprezentowane w podrozdziale 9.4.2. [3].

Wydaje się, że omówione w tym podrozdziale wyniki badań są pierwszym tego rodzaju opisem bocznego odchylenia pasm chromatograficznych chiralnych analitów przy pomocy chiralnej fazy stacjonarnej w literaturze chromatograficznej. Jest zatem oczywiste, że stosowanie detekcji densytometrycznej przy rozdzielach chiralnych wykonywanych techniką chromatografii cienkowsarstwowej musi być prowadzone bardzo ostrożnie, gdyż należy liczyć się z możliwością wystąpienia w takich przypadkach znaczących, bocznych odchylen pasm chromatograficznych od pionowego kierunku rozwijania chromatogramu. Dlatego też konieczne jest skanowanie tego rodzaju chromatogramów wzdłuż kilku, lub nawet kilkudziesięciu linii w niewielkich odstępach między sobą.

Wyniki przedstawionych w niniejszej pracy badań sugerują, że zastosowany czynnik chiralny w postaci L-argininy naniesionej na żel krzemionkowy jako impregnant umożliwia rozdział trzech wybranych par enancjomerów dwuwymiarowo, tzn. rozdział ten zachodzi zgodnie z kierunkiem rozwijania chromatogramu, jak również w kierunku do niego prostopadłym. Taki dwuwymiarowy rozdział enancjomerów z pewnością poprawia całkowity efekt rozdzielczy.

W dalszych badaniach zespołu kierowanego przez Kowalską, a wykraczających poza zakres niniejszej pracy udało się jednak wykazać, że sam żel krzemionkowy jest także substancją chiralną [17] (dotychczas wśród chromatografistów panowało przekonanie, że krzemionka jest amorficzna) i zdolną do bocznego odchylenia dróg migracji chiralnych analitów od kierunku migracji fazy ruchomej. Tak więc trudno jest ostatecznie stwierdzić, czy zjawisko opisane w niniejszym podrozdziale, tj. dwuwymiarowy rozdział antymerów profenów techniką jednokierunkowej chromatografii cienkowsarstwowej jest spowodowany oddziaływaniami międzycząsteczkowymi analitów z L-argininą, z żelem krzemionkowym, czy też oboma tymi rodzajami oddziaływań jednocześnie.

9.5. Streszczenie i wnioski

W niniejszej pracy udało się zrealizować wszystkie, założone na początku cele badawcze. Jako zasadnicze osiągnięcia tej pracy należy wymienić, co następuje:

- Stosując jako podstawowe narzędzie badawcze chromatografię cienkowarstwową z chiralną fazą stacjonarną udało się wykazać, iż roztwory trzech wybranych profenów (tj. ibuprofenu, naproksenu i kwasu 2-fenylpropionowego) w dwóch niskocząsteczkowych rozpuszczalnikach wodnych oraz w jednym niskocząsteczkowym rozpuszczalniku niewodnym ulegają samorzutnemu procesowi oscylacyjnej transenancjomeryzacji. Zjawisko to zostało dodatkowo zademonstrowane przy pomocy wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) oraz potwierdzone przy pomocy odpowiednich pomiarów polarymetrycznych.
- Zaproponowano nietypowe zastosowania spektroskopii protonowego rezonansu magnetycznego (^1H NMR) oraz HPLC celem wykazania podwyższonej lepkości i/lub wzrostu uporządkowania molekuł wchodzących w skład badanych roztworów profenów.
- Przeprowadzono rozważania nad molekularnym mechanizmem transenancjomeryzacji profenów i opierając się na doniesieniach literaturowych wytypowano dwa takie mechanizmy jako dopuszczalne i mogące występować alternatywnie bądź komplementarnie.
- Przeprowadzono rozważania nad czynnikiem generującym oscylacje w przypadku transenancjomeryzacji badanych profenów. Stwierdzono, iż najbardziej prawdopodobna wydaje się lepkość roztworów rozpatrywanych profenów i/lub zdolność do określonej samoorganizacji molekuł w obrębie tych roztworów. W przypadku sprzężenia kinetyki reakcji chemicznych z dyfuzją produktu pośredniego może nastąpić destabilizacja jednorodnego stanu stacjonarnego i powstanie uporządkowań przestrzennych, powodujące oscylacyjne zmiany stężenia produktu pośredniego w funkcji czasu.

Ponadto w niniejszej pracy udało się zrealizować następujące, dodatkowe cele poznawcze:

- Potwierdzono dużą skuteczność chromatografii cienkowarstwowej z chiralną fazą stacjonarną do bezpośrednich rozdziałów par antymerów, mimo iż nadal jest to technika rozdzielcza stosunkowo najrzadziej do tego celu wykorzystywana.

- Przedstawiono na przykładzie całości materiału stanowiącego treść niniejszej pracy dużą przydatność techniki chromatografii cienkowarstwowej do prowadzenia określonych badań z zakresu chemii fizycznej oraz chemii organicznej.
- Po raz pierwszy udało się doświadczalnie wykazać możliwość dwukierunkowego rozdziału wybranych par antymerów techniką jednokierunkowej chromatografii cienkowarstwowej. W ten sposób została również zademonstrowana stereospecyficzność procesu retencji w chiralnej chromatografii cienkowarstwowej.

Jakkolwiek trudno ze stuprocentową pewnością twierdzić, że szczególne zachowanie profenów w wybranych roztworach rozpuszczalników wodnych i niewodnych to wyłącznie oscylacyjna transeńcijomeryzacja, to jednak istnieją pewne argumenty i fakty, bardzo silnie przemawiające za taką właśnie, a nie inną interpretacją. Poniżej przedstawiono najważniejsze z nich.

1. Oscylacyjne zmiany wartości liczbowych współczynnika retencji w chromatografii cienkowarstwowej (R_F) z całą pewnością nie są spowodowane oscylacjami stopnia agregacji, ani też oscylacjami sposobu uporządkowania struktur supramolekularnych z udziałem cząsteczek rozpatrywanych profenów.
 - (a) Po pierwsze, chiralne układy chromatograficzne z samej swojej istoty służą do rozdziału par enancjomerów na dwa antymery, nie zaś do „konserwowania” struktur nie rozdzielonych agregatów supramolekularnych, zbudowanych z czystego optycznie, pojedynczego indywiduum chemicznego.
 - (b) Po wtóre, w stosowanych w niniejszej pracy układach chromatograficznych w liniowym zakresie izotermii adsorpcji stężenie analitów w fazie ruchomej, znajdującej się w porach adsorbentu, jest bardzo niskie, rzędu 1×10^{-2} do 1×10^{-3} mola dm^{-3} (na poszczególnych chromatogramach znajdowało się po kilkadziesiąt nanogramów badanych substancji). Przy tak niskich stężeniach analitów i dodatkowo w obecności adsorbentu, który poprzez oddziaływania międzycząsteczkowe destruktywnie wpływa na ewentualne struktury supramolekularne (tj. niweczy tzw. oddziaływania boczne), trudno byłoby przypisać oscylujące wartości liczbowe parametru retencji (R_F) zachowywaniu przez dany układ chromatograficzny takich właśnie struktur o zmiennej, lecz wysokiej liczbie zasocjowanych cząsteczek przez cały, ponad jednogodzinny czas trwania procesu chromatograficznego.

(c) Po trzecie, wąskie i symetryczne kształty profili stężeniowych pasm chromatograficznych badanych w niniejszej pracy (i w stanie początkowym czystych optycznie) profenów, tzn. *S*-(+)-ibuprofenu oraz *S*-(+)-naproksenu, w położeniach ekstremalnych na chromatogramie (to znaczy w położeniach o najniższej i najwyższej wartości parametru retencyjnego R_F) wskazują na to, iż w obu przypadkach mamy tu do czynienia z pojedynczymi indywiduami chemicznymi. Ponadto wartości liczbowe parametru retencji R_F dla pojawiających się najniżej profili stężeniowych odpowiadają pozycji enancjomerów *R*-(-) badanych profenów, natomiast wartości liczbowe parametru retencji R_F dla pojawiających się najwyżej profili stężeniowych odpowiadają pozycji enancjomerów *S*-(+). Na tej podstawie możemy wnioskować, że profil o najniższej wartości parametru R_F odpowiada czystemu enancjomerowi *R*-(-), a profil o najwyższej wartości parametru R_F odpowiada czystemu enancjomerowi *S*-(+). Profile stężeniowe pasm chromatograficznych w pozycjach pośrednich między ekstremalnymi wskazują natomiast na obecność dwóch nie całkowicie rozdzielonych indywiduów chemicznych, jakimi są najprawdopodobniej antymery *S*-(+) i *R*-(-).

(d) Wreszcie po czwarte, rozdziały enancjomeryczne racemicznych mieszanin profenów techniką chiralnej chromatografii cienkowarstwowej są nie tylko możliwe, ale prowadzone na szeroką skalę. Wiele takich rozdziałów było już wcześniej realizowanych w dokładnie takich samych, bądź w zbliżonych układach chromatografii planarnej jak te, zastosowane w niniejszej pracy. Podstawowa różnica między udanymi rezultatami wcześniejszych rozdziałów enancjomerycznych oraz naszymi własnymi wynikami polega na tym, że wcześniejsze rozdziały były prowadzone dla świeżo sporządzanych roztworów, my natomiast wielokrotnie powtarzaliśmy badania dla roztworów przechowywanych przez dłuższy okres czasu, po czym na zakończenie analizowaliśmy zmiany wartości parametru retencyjnego w funkcji czasu.

2. W jednym z przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy eksperymentów wykazano, iż w środowisku zasadowym *S*-(+)-naproksen najpierw ulega szybkiej, strukturalnej inwersji i w znacznym stopniu przekształca się w *R*-(-)-naproksen, co nie wiąże się z oscylacyjnymi zmianami skręcalności właściwej roztworu. W drugim eksperymencie, przeprowadzonym w środowisku kwaśnym, *S*-(+)-naproksen nie ulegał strukturalnej inwersji i również nie wykazywał oscylacyjnych zmian skręcalności właściwej. Obserwacje powyższe są zgodne z ogólną wiedzą na temat mechanizmów reakcji w

chemii organicznej. Wiadomo, iż tautomeryzacja keto-enolowa kwasów karboksylowych (lub powstawanie odpowiednich anionów enolanowych) stosunkowo łatwo zachodzi w środowisku zasadowym, natomiast wcale nie zachodzi w środowisku kwaśnym. Skądinąd też wiadomo, iż woda oraz niższe alkohole są rozpuszczalnikami amfiprotycznymi, zachowującymi się jednocześnie jak słabe zasady i słabe kwasy. Obserwowane w niniejszej pracy oscylacje skręcalności właściwej roztworów wybranych profenów znacznie silniej występują w roztworach etanolowo-wodnych, aniżeli w nisko polarnym rozpuszczalniku organicznym. Wydaje się, że amfiprotyczny charakter rozpuszczalnika etanolowo-wodnego w połączeniu z potwierdzoną doświadczalnie zdolnością profenów do pewnej samoorganizacji molekuł w roztworach może w efekcie doprowadzić do oscylacyjnej reakcji transenancjomeryzacji, wynikającej ze sprzężenia czynnika kinetycznego oraz czynnika dyfuzyjnego. W przypadku pozbawionego właściwości amfiprotycznych, niskopolarnego rozpuszczalnika organicznego oscylacje przebiegają znacznie słabiej.

3. Obok amfiprotycznego charakteru rozpuszczalnika etanolowo-wodnego istnieje jeszcze inny aspekt związany z efektywnością oscylacyjnych zmian, obserwowanych w tym właśnie rozpuszczalniku. Inwersja strukturalna profenów nie zachodzi bezpośrednio, ale poprzez stadium pośrednie, jakim jest powstawanie keto-enolu (bądź anionu enolanowego). Zatem kroki elementarne tego procesu posiadają charakter jonowy, ten zaś może najefektywniej zachodzić właśnie w środowisku wodnym.
4. Badaniom przeprowadzonym w niniejszej pracy poddano S-(+)-naproksen rozpuszczony i przez dłuższy okres czasu przechowywany w trzech roztworach o takim samym składzie ilościowym (i o zbliżonym składzie jakościowym): (i) etanol – bufor o pH 9 (7:3, v/v); (ii) etanol – woda (7:3, v/v); (iii) etanol – lodowaty kwas octowy (7:3, v/v). Gdyby samorzutne, oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej S-(+)-naproksenu były wynikiem np. przemian strukturalnych na poziomie supramolekularnym (tzn. powstawania agregatów molekularnych o zmiennej strukturze oraz o zmiennej liczbie przyporządkowanych cząsteczek), można by słusznie oczekiwać, iż w każdym z tych trzech roztworów zaobserwujemy zbliżone, oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej. Tymczasem zmiany takie zaobserwowano wyłącznie w jednym przypadku, mianowicie w rozpuszczalniku etanol – woda (7:3, v/v).

5. Zdolność do inwersji strukturalnej (tj. transenancjomeryzacji) wybranych profenów (np. ibuprofenu i naproksenu) *in vivo* była już wcześniej przedmiotem licznych doniesień z zakresu nauk farmaceutycznych i biomedycznych. W niniejszej pracy po raz pierwszy stwierdzono, że istnieje możliwość zachodzenia inwersji strukturalnej profenów również *in vitro*. W chwili obecnej istnienie takiej możliwości zostało potwierdzone doświadczalnie przez inny zespół badawczy, również zajmujący się tym zagadnieniem.

9.6. Literatura

1. R. Bhushan, V. Parshad, J. Chromatogr. A, **721**, 369 (1996)
2. M. Sajewicz, R. Piętka, T. Kowalska, J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC, **17**, 173 (2004)
3. M. Sajewicz, R. Piętka, A. Pieniak, T. Kowalska, Acta Chromatogr., **15**, 131 (2005)
4. A. Pieniak, K. Kaczmarek, M. Sajewicz, W. Zapała, A. Gołębiowska, R. Tomala, T. Kowalska, Acta Chromatogr., **14**, 16 (2004)
5. T. Bando, Y. Namba, K. Shishido, Tetrahedron-Asymmetr., **8**, 2159 (1997)
6. E. J. Ebberts, G. J. A. Ariaans, A. Bruggink, B. Zwanenburg, Tetrahedron-Asymmetr., **10**, 3701 (1999)
7. Z.-L. Wu, Z.-Y. Li, Tetrahedron-Asymmetr., **12**, 3305 (2001)
8. X. Yuan, J. Li, Y. Tian, G.-H. Lee, X.-M. Peng, R. Zhu, X. You, Tetrahedron-Asymmetr., **12**, 3015 (2001)
9. V. K. Tandon, Tetrahedron Lett., **42**, 5985 (2001)
10. M. Sajewicz, R. Piętka, A. Pieniak, T. Kowalska, J. Chromatogr. Sci., **43**, 542-548 (2005)
11. M. Sajewicz, R. Piętka, A. Pieniak, T. Kowalska, J. Liq. Chromatogr. Related Technol., **29**, 2059 (2006)
12. P. Belanger, J. G. Atkinson, R. S. Stuart, Chem. Commun., 1067 (1969)
13. Y. Xie, H. Liu, J. Chen, Int. J. Pharm., **196**, 21 (2000)
14. J. McMurry, Chemia organiczna, PWN, Warszawa, 2003
15. M. Sajewicz, R. Piętka, P. Kuś, T. Kowalska, Acta Chromatogr., **16**, 181 (2006)
16. M. Sajewicz, R. Piętka, G. Drabik, E. Namysło, T. Kowalska, J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC, **19**, 273 (2006)
17. M. Sajewicz, H.-E. Hauck, G. Drabik, E. Namysło, B. Głód, T. Kowalska, J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC, **19**, 278 (2006)

10. Aneks (publikacje wchodzące w zakres tematyczny pracy doktorskiej)

1. "Chiral separation of S-(+)- and R-(-)-ibuprofen by thin-layer chromatography. An improved analytical procedure"
M. Sajewicz, **R. Piętka**, T. Kowalska
J. Planar Chromatogr. - Modern TLC, **17**, 173-176 (2004)
2. "Chiral separations of ibuprofen and propranolol by TLC. A study of the mechanism and thermodynamics of retention"
M. Sajewicz, **R. Piętka**, T. Kowalska
Proceedings of the Workshop "Process Integration and Modeling Chromatography Processes", Rzeszów-Boguchwała, 27th-29 September, 2004; str. 203-214
3. Application of thin-layer chromatography (TLC) to investigating oscillatory instability of the selected profen enantiomers"
M. Sajewicz, **R. Piętka**, A. Pieniak, T. Kowalska
Acta Chromatogr., **15**, 131-149 (2005)
4. "Oscillatory Instability of the Selected Profen Enantiomers. Part I. Alcohol-Aqueous Medium as a Solvent"
M. Sajewicz, **R. Piętka**, A. Pieniak, T. Kowalska
Proceedings of the International Symposium on Planar Separations Symposium "Planar Chromatography 2005", Siófok, Hungary 23rd-25th May, 2005; str. 161-177
5. "Oscillatory Instability of the Selected Profen Enantiomers. Part II. Application of Dichloromethane as a Solvent"
M. Sajewicz, **R. Piętka**, A. Pieniak, T. Kowalska
Proceedings of the International Symposium on Planar Separations Symposium "Planar Chromatography 2005", Siófok, Hungary, 23rd-25th May, 2005; str. 561-577
6. "Chiral separations of ibuprofen and propranolol by TLC. A study of the mechanism and thermodynamics of retention"
M. Sajewicz, **R. Piętka**, T. Kowalska
J. Liq. Chromatogr. Related Technol., **28**, 2499-2513 (2005)
7. "Application of thin-layer chromatography (TLC) to investigating oscillatory instability of the selected profen enantiomers in dichloromethane"
M. Sajewicz, **R. Piętka**, A. Pieniak, T. Kowalska
J. Chromatogr. Sci., **43**, 542-548 (2005)
8. "On the gelation of profens as a property causing their oscillatory transenantiomerization"
M. Sajewicz, **R. Piętka**, P. Kuś, T. Kowalska
Acta Chromatogr., **16**, 181-191 (2006)

9. "Application of thin-layer chromatography to investigation oscillatory instability of the selected profen enantiomers in physiological salt"
M. Sajewicz, **R. Piętka**, A. Pieniak, T. Kowalska
J. Liq. Chromatogr. Related Technol., **29**, 2059-2069 (2006)
10. "On the mechanism of oscillatory changes of the retardation Factor (R_F) and specific rotation $[\alpha]_D$ with selected solutions of S-(+)-naproxen"
M. Sajewicz, **R. Piętka**, G. Drabik, T. Kowalska
J. Liq. Chromatogr. Related Technol., **29**, 2071-2082 (2006)
11. "On the stereochemically peculiar two-dimensional separation of 2-arylpropionic acids by chiral TLC"
M. Sajewicz, **R. Piętka**, G. Drabik, E. Namysło, T. Kowalska
J. Planar Chromatogr., **19**, 273-277 (2006)